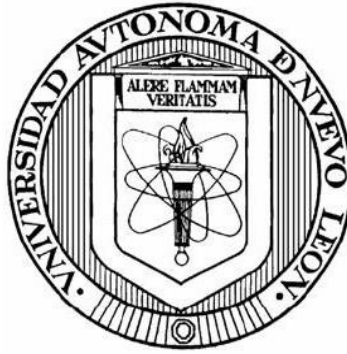


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO ANTIVIRAL DE CITOCINAS EXPRESADAS EN  
CÉLULAS MA-104 INFECTADAS CON ROTAVIRUS.

Por

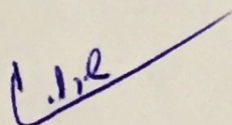
TANIA GUADALUPE HEREDIA TORRES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN  
EN INMUNOBIOLOGÍA

Febrero 2020

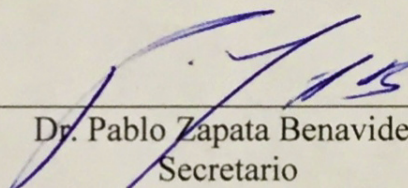
EFFECTO ANTIVIRAL DE CITOCINAS EXPRESADAS EN CÉLULAS MA-104  
INFECTADAS CON ROTAVIRUS

Comité de Tesis



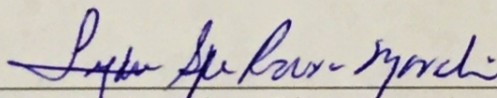
---

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero  
Presidente



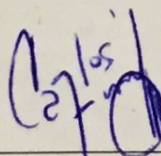
---

Dr. Pablo Zapata Benavides  
Secretario



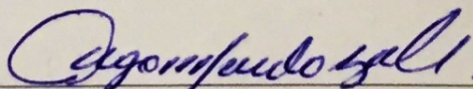
---

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales  
Vocal



---

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna  
Vocal



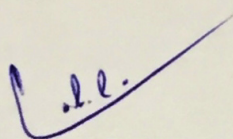
---

Dr. Edgar Mendoza Gamboa  
Vocal



EFECTO ANTIVIRAL DE CITOCINAS EXPRESADAS EN CÉLULAS MA-104  
INFECTADAS CON ROTAVIRUS

Dirección de Tesis



---

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Director

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo de investigación se realizó en la unidad de Virología del Laboratorio de Inmunología y Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Contreras Cordero.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco plenamente a todas las personas e instituciones que me apoyaron desde el inicio con la realización de este proyecto de investigación para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias con Orientación en Inmunobiología.

Gracias al **Dr. Juan Francisco Contreras Cordero** por permitirme desarrollar este trabajo bajo su dirección. Agradezco su disciplina y su paciencia. Me enseñó a exigirme y lograr ser mejor persona en todos los aspectos.

Gracias a la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, directora del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, por permitirme realizar mi tesis de maestría en este laboratorio.

Gracias a mi comité de tesis conformado por el **Dr. Pablo Zapata Benavides**, la **Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales**, el **Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna** y el **Dr. Edgar Mendoza Gamboa** por su enriquecimiento profesional en el desarrollo del proyecto de tesis.

Gracias al **Departamento de Botánica** de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, por las facilidades otorgadas para el uso del equipo de PCR tiempo real que fue indispensable para la realización del trabajo de investigación.

Gracias al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado para la realización y manutención de mis estudios de posgrado. Asimismo, agradezco al **Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT)** por el apoyo económico otorgado para la realización del proyecto.

Infinitas gracias a mis compañeros de laboratorio, **Claudia Bernadette Plata Hipólito**, **Yuliet Ramírez Cintra** y **Alejandro José Rodríguez García** por su valioso apoyo en aspectos técnicos y estandarización de protocolos necesarios para el desarrollo del proyecto. Muchas gracias por generar un excelente e incomparable ambiente de trabajo. Asimismo, agradezco por brindarme su valiosísima amistad que se volvió uno de mis pilares durante este tiempo.

Gracias a mis compañeros de la maestría por brindarme su apoyo a lo largo del programa académico de posgrado. En especial, gracias a **Zaira Lucero Castro Delgado**, **Luis Mario**

**Madrigal de León, José Roberto Estupiñán Jiménez y Ricardo Romero Argüelles** por todos los momentos que compartimos haciendo más placentera esta etapa.

Gracias a las personas que aparecieron cuando menos lo esperaba, **Pedro Alejandro Avitia Rodríguez** por estar conmigo en todo momento y tener las palabras adecuadas en el momento indicado; **Sergio Alonso Romo Marín** por sacarme una sonrisa incluso en los días más difíciles; y a **Cristian Asiel Moreno Moncada** por su cariño, sinceridad, confianza y compañía tan inesperada y enriquecedora. Por llegar a mi vida cuando más lo necesité y por compartir conmigo los momentos más difíciles para poder terminar esta etapa en mi vida.

Gracias a **Edeer Iván Montoya Hinojosa** por su amistad incondicional durante tantos años. Gracias por compartir el planear, desarrollar y terminar esta meta juntos. Gracias por su confianza y apoyo en todos los sentidos. Finalmente, gracias por formar parte de esa familia que uno escoge.

Gracias al pilar más grande, **mi familia**, por su apoyo, cariño y enseñanza incondicional. A mis padres, **Homero Heredia Córdova y Carmen Gloria Torres Pérez** por brindarme todo lo necesario para llegar hasta este punto. Por seguir impulsando y apoyando mi crecimiento personal y académico a pesar del tiempo y la distancia. A mis hermanos, **Ana Perla Heredia Torres** por enseñarme cómo tener coraje y fuerza para cuando más lo requiera, **David Homero Heredia Torres** por enseñarme cómo seguir esforzándome cada día para ser mejor persona. A **Dominga y Concepción** por demostrarme que vivir es aprender y disfrutar de todo momento. A todos, por siempre guiarme por el camino adecuado y por enseñarme a respetar, perdonar y amar a pesar de las dificultades.

Gracias a la vida por brindarme la salud y la fortaleza necesaria para haber llegado hasta este punto y para lograr sobrellevar día a día este proyecto que más que una meta se convirtió en toda una enseñanza de vida.

## DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres, por ser esa semilla que me brinda siempre lo necesario para poder seguir brindando frutos. Los amo.

*“De la semilla nacen fijas raíces, un fuerte tronco, ramas encauzadas, abastecedoras hojas y las flores más hermosas y productivas, todo aquello para poder brindar un buen fruto.”*

ÍNDICE	pág.
LUGAR DE TRABAJO	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Estructura viral	5
2.2. Ciclo replicativo.	7
2.3. Patogénesis.	8
2.4. Expresión de citocinas durante infección viral.	9
2.5. Citocinas en la activación de la respuesta inmunológica.	11
2.6. Efecto antiviral de citocinas.	14
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
6. METODOLOGÍA	20
6.1. Subcultivo celular.	20
6.2. Propagación de la cepa Wa de rotavirus en células MA-104.	20
6.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	20



6.4.	Dot-Blot	21
6.5.	Extracción de RNA	21
6.6.	Electroforesis en gel de poliacrilamida de ARN de rotavirus	21
6.7.	Transcripción reversa	21
6.8.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.	22
6.9.	Purificación de productos de PCR.	23
6.10.	. Análisis de secuencias.	23
6.11.	PCR tiempo real.	24
6.12.	Expresión relativa.	24
6.13.	Interferencia viral.	25
6.14.	Microtitulación de Unidades Formadoras de Focos.	26
6.15.	Silenciamiento génico.	27
7.	RESULTADOS	28
7.1.	Propagación de la cepa de rotavirus Wa en células MA-104.	28
7.2.	Expresión de IFN- $\beta$ y TNF- $\alpha$ en células MA-104 infectadas con rotavirus	30
7.3.	Análisis de las secuencia de nucleótidos obtenidas.	31
7.4.	Expresión de IFN- $\beta$ y TNF- $\alpha$ en células MA-104 infectadas con rotavirus.	34
7.5.	Efecto antiviral de lisados de células MA-104 infectadas con rotavirus.	37
7.6.	Efecto antiviral del IFN- $\beta$ y TNF- $\alpha$ en células MA-104 infectadas con rotavirus.	39
8.	DISCUSIÓN	43
9.	CONCLUSIONES	46
10.	PERSPECTIVAS	47
11.	BIBLIOGRAFÍA	48
12.	RESUMEN BIOGRÁFICO	60
13.	APÉNDICE	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
1 Oligonucleótidos específicos para cada gen a amplificar. ....	22
2 Condiciones por reacción de retrotranscripción. ....	22
3 Condiciones por reacción de PCR punto final. ....	23
4 Condiciones por reacción de PCR tiempo real. ....	24
5 Valores obtenidos del análisis de PCR tiempo real para la expresión del IFN- $\beta$ ...	35
6 Valores obtenidos del análisis de PCR tiempo real para la expresión del TNF- $\alpha$ ...	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Conformación estructural de rotavirus. ....	6
2	Producción de citocinas a través de la activación de receptores ante la infección con rotavirus.....	10
3	Efecto de citocinas expresadas por células infectadas con virus, en la activación de células inmunológicas. ....	14
4	Efecto antiviral generado por la expresión y el reconocimiento de IFN tipo I y tipo III inducido por una infección viral. ....	15
5	Efecto citopático de rotavirus Wa en células MA-104.....	28
6	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de ARN de rotavirus extraído de alícuotas celulares. ....	29
7	Producción de proteínas de células MA-104 en distintos tiempos de infección con rotavirus.. ....	30
8	Electroforesis de productos de RT-PCR de IFN- $\beta$ en gel de poliacrilamida.....	30
9	Electroforesis de productos de RT-PCR de TNF- $\alpha$ en gel de poliacrilamida.....	31
10	Electroforesis para purificación de productos de RT-PCR .....	31
11	Cromatogramas de la secuencia de nucleótidos de los productos purificados. ..	32
12	Análisis de identidad de la secuencia obtenida del IFN- $\beta$ utilizando el programa BLAST nucleotide (NCBI).....	33
13	Análisis de identidad de la secuencia obtenida del TNF- $\alpha$ utilizando el programa BLAST nucleotide (NCBI).....	33
14	Curvas de amplificación de productos obtenidos por PCR tiempo real. ....	34
15	Curvas de disociación de genes amplificados por PCR tiempo real.. ....	35
16	Expresión del IFN- $\beta$ y TNF- $\alpha$ durante la infección con rotavirus. ....	36
17	Efecto citopático a las 8 horas de infección primaria con rotavirus Wa en células MA-104.....	37
18	Efecto citopático a distintas horas de infección secundaria con rotavirus Wa en células MA-104 previamente infectadas. ....	38

19	Microtitulación de rotavirus por Unidades Formadoras de Focos. ....	39
20	Expresión de IFN- $\beta$ en células MA-104 infectadas con rotavirus. ....	40
21	Expresión de TNF- $\alpha$ en células MA-104 infectadas con rotavirus. ....	40
22	Efecto del silenciamiento de citocinas en células MA-104 infectadas con rotavirus .....	41
23	Expresión de IFN- $\beta$ y TNF- $\alpha$ en células MA-104 infectadas con rotavirus.....	42
24	Efecto del silenciamiento simultáneo de citocinas en células MA-104 infectadas con rotavirus. ....	42



## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

MA-104	Células epiteliales de riñón de mono verde africano
CDC	Centro de control y prevención de enfermedades
nm	Nanómetro
Kpb	Kilo pares de bases
TLP	Partículas de triple capa
NSP	Proteína no estructural
VP	Proteína viral
ICTV	Comité internacional de taxonomía de virus
RVA	Rotavirus especie A
hsc	proteína de choque térmico
DLP	Partícula de doble capa
SNE	Sistema nervioso entérico
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
TLR	Receptor tipo toll
RIG	Gen inducible por ácido retinoico
MDA	Proteína asociada a la diferenciación del melanoma
NOD	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
ECD	Ectodominios
LRR	Repeticiones ricas en leucina
ARNdc	Ácido ribonucleico de doble cadena
ARNcs	Ácido ribonucleico de cadena sencilla

IRF	Factor regulador de interferón
TRIF	Factor adaptador inductor de IFN con dominio TIR
TRAF	Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TANK	Activador de NF- $\kappa$ B asociado a la familia TRAF
TBK	Quinasa de unión a TANK
IKK	Quinasa I $\kappa$ B
NAP	Proteína asociada a la cinasa activadora de NF $\kappa$ B
IFN	Interferón
TRADD	Proteína con dominio de muerte asociada al receptor del TNF
RIP	Proteína de interacción con el receptor
TAK	Quinasa activada del factor de crecimiento transformante
NF $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
IRAK	Quinasa asociada al receptor de interleucina 1
IPS	Estimulador del promotor de interferón
NLR	Receptores tipo NOD
NLRP	Receptor tipo NOD que contiene un dominio de pirina
ASC	Proteína asociada a la apoptosis que contiene CARD
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasa
IL	Interleucina
TNF	Factor de necrosis tumoral
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
CXCL	Ligando de quimiocina (motivo C-X-C)

IFNAR	Receptor de interferón $\alpha/\beta$
CD	Célula dendrítica
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NK	Célula asesina natural
STAT	Transductor de señal y activador de transcripción
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
FasL	Ligando de Fas
LTC	Linfocito T citotóxico
LTh	Linfocito T cooperador
ROR $\gamma$	Receptor gamma huérfano relacionado con RAR
T-bet	Proteína de caja T
Treg	Linfocito T regulador
GATA	Factor de transcripción de unión a secuencias GATA
FOXP	Proteína de caja de horquilla
TGF	Factor de crecimiento transformante
M2	Macrófago tipo 2
ISG	Genes estimulados por interferón

## RESUMEN

Durante la internalización de rotavirus a la célula, el ARN viral puede exponerse y reconocerse mediante diversos receptores desencadenando vías de señalización que dan lugar a la producción de diversas citocinas. El IFN- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  son citocinas claves en la activación de macrófagos, células dendríticas y células NK. En las células infectadas, el IFN- $\beta$  actúa de forma autocrina y paracrina como una señal de alerta ante una infección viral e induce la producción de proteínas capaces de inhibir la replicación de los virus. Sin embargo, no está claro si el TNF- $\alpha$  también ejerce actividad antiviral en un sistema libre de células del sistema inmunológico. El objetivo de este proyecto fue evaluar la expresión y el efecto antiviral del IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en células MA-104 infectadas con rotavirus. Las células fueron infectadas con la cepa prototipo Wa de rotavirus humano y la infección productiva se determinó a través de la detección del efecto citopático, la expresión de proteínas virales y la visualización de los electroferotipos específicos de rotavirus a distintas horas de infección. Los niveles de expresión del IFN- $\beta$  y del TNF- $\alpha$  se determinaron a través de RT-PCR punto final y RT-qPCR y se evaluó el efecto antiviral de esta expresión a través de microtitulación por unidades formadoras de focos en células infectadas con rotavirus y con un sistema de ARN de interferencia para inhibir la expresión del IFN- $\beta$  y del TNF- $\alpha$ . El efecto citopático, los 11 segmentos característicos de rotavirus, así como la producción de proteínas virales, se presentaron desde las primeras horas de infección. Se obtuvo un aumento en la expresión de IFN- $\beta$  y de TNF- $\alpha$  a partir de las 8 horas post-infección, con un aumento significativo a las 24 horas. El uso de lisados con estas citocinas expresadas generó una disminución de las unidades formadoras de foco en células infectadas con rotavirus. El silenciamiento individual y combinado del IFN- $\beta$  y del TNF- $\alpha$  generó un aumento en las unidades formadoras de focos con respecto al control. Este estudio da evidencia de que durante una infección con rotavirus en células MA-104 se induce un efecto antiviral a través de la expresión tanto de IFN- $\beta$  como del TNF- $\alpha$ .



## ABSTRACT

During internalization of rotavirus to the cell, viral RNA can be exposed and recognized by several receptors triggering signaling pathways that lead to the production of many cytokines. IFN- $\beta$  and TNF- $\alpha$  are key cytokines in the activation of macrophages, dendritic cells and NK cells. In infected cells, IFN- $\beta$  acts in an autocrine and paracrine manner as a warning signal against a viral infection and induces the production of proteins capable of inhibiting virus replication. However, it is not clear whether TNF- $\alpha$  also exerts antiviral activity in an immune cell free culture. The objective of this project was to evaluate expression and antiviral effect of IFN- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in MA-104 cells infected with rotavirus. Cells were infected with the prototype Wa strain of human rotavirus and productive infection was determined through the detection of the cytopathic effect, the expression of viral proteins and the visualization of specific rotavirus electroferotypes at different hours post-infection. Expression levels of IFN- $\beta$  and TNF- $\alpha$  were determined by RT-PCR endpoint and RT-qPCR and the antiviral effect of this expression was evaluated through microtiter by focus forming units in rotavirus infected cells and with an interfering RNA system to inhibit IFN- $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression. The cytopathic effect, the 11 characteristic segments of rotavirus, as well as the production of viral proteins, appeared from the first hours of infection. An increase in the expression of IFN- $\beta$  and TNF- $\alpha$  was obtained from 8 hours post-infection, with a significant increase at 24 hours. Use of lysates with these expressed cytokines generated a decrease in the focus forming units in rotavirus infected cells. Individual and combined silencing of IFN- $\beta$  and TNF- $\alpha$  generated an increase in focus forming units with respect to the control. This study gives evidence that during a rotavirus infection in MA-104 cells an antiviral effect is induced through the expression of both IFN- $\beta$  and TNF- $\alpha$ .

## 1. INTRODUCCIÓN

Rotavirus, particularmente la especie *Rotavirus A*, es la principal causa de diarrea deshidratante severa en infantes menores de 5 años y representa el 40% de los casos de hospitalización de niños en diversos países. Este virus causa alrededor de 250,000 muertes al año a nivel mundial (Tate *et al.*, 2016). Los infantes afectados pueden desarrollar diversos signos y síntomas, dentro de los más representativos se encuentran fiebre, vómito y diarrea (O'Ryan, 2011). La prevención de la deshidratación, el reemplazo de líquidos y la administración de suplementos de zinc continúan siendo las intervenciones clave para tratar la deshidratación severa.

Actualmente existen vacunas orales contra rotavirus como RotaTeq (Merck), una vacuna pentavalente y Rotarix (GlaxoSmithK-line), una monovalente. Estas vacunas son altamente recomendadas para prevenir la infección de rotavirus (WHO, 2013). Sin embargo, son relativamente poco eficientes con cepas de rotavirus antigénicamente distintas. Por tal motivo, es de suma importancia contar con una mejor comprensión de la inmunidad antiviral que se genera durante los procesos tempranos de la infección para aumentar la eficiencia de los biológicos o bien, desarrollar alternativas que contribuyan al tratamiento y prevención de la infección (Angel *et al.*, 2014; Telmesani, 2010).

Durante la replicación de rotavirus en la célula, proteínas y material genético viral puede exponerse y reconocerse mediante diversos tipos de receptores celulares que desencadenan diversas cascadas de señalización, activando diferentes factores de transcripción y dando lugar a la expresión de diversas citocinas (Mogensen y Paludan, 2001). Estas citocinas juegan un rol muy importante para la activación de la respuesta inmune que protege contra la infección (B Jiang *et al.*, 2003).

La persona infectada responde desarrollando un proceso de inmunidad innata inespecífica y de inmunidad adaptativa específica. La inmunidad innata ocurre dentro de los primeros días de la infección y juega un rol muy importante para resolver la infección mediante diversos mecanismos incluyendo la activación de células inmunes y vías proinflamatorias (Delves *et al.*, 2017; Owen *et al.*, 2013). En contraste, la inmunidad adaptativa específica aparece más tarde y protege al hospedero de la infección viral a través de células T

específicas y la respuesta de anticuerpos neutralizantes (Baoming Jiang *et al.*, 2002). Ambos procesos de inmunidad son mediados por la acción de diversas citocinas (Owen *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha demostrado que diversas citocinas funcionan también como mediadores en un estado antiviral que finalmente inhiben la replicación viral (López *et al.*, 2016).

El estudio de interferencia viral en un sistema *in vitro* permitió el descubrimiento de la actividad antiviral del interferón (Lindenmann *et al.*, 1957). El interferón es capaz de inducir la producción de proteínas con la capacidad de inhibir la replicación de diversos virus (López *et al.*, 2016). Con el paso de los años el estudio *in vitro* de otras citocinas pro-inflamatorias y con potencial antiviral ha sido evaluado contra diversos virus, obteniendo resultados prometedores (M. S. Hakim *et al.*, 2018; Mestan *et al.*, 1986; Seo y Webster, 2002; Wong *et al.*, 1988). Sin embargo, la actividad antiviral de diversas citocinas no ha sido del todo caracterizado en la defensa celular contra rotavirus. Por tal motivo, este estudio, va dirigido a determinar el efecto antiviral del IFN- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  expresados en células epiteliales MA-104 en un sistema libre de células del sistema inmunológico.

## 2. ANTECEDENTES

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) define a rotavirus como un virus contagioso que puede causar gastroenteritis. Los síntomas de la infección incluyen diarrea acuosa severa, vómito, fiebre y dolor abdominal, siendo los bebés y niños pequeños más propensos a contraer dicha enfermedad. La gravedad radica en la deshidratación causante de hospitalizaciones e incluso muertes (CDC, 2019).

Estudios epidemiológicos han indicado que rotavirus es un agente etiológico importante de gastroenteritis y es responsable de un gran número de hospitalizaciones en niños pequeños y recién nacidos. Se estima que la infección por rotavirus ocasiona alrededor de 200,000 muertes al año a nivel mundial (A. Clark *et al.*, 2017).

El primer caso de rotavirus asociado a humanos fue descubierto en 1973 e informado por Bishop y colaboradores en Australia. El virus fue visualizado a través de microscopia electrónica en una biopsia intestinal de niños con gastroenteritis (Bishop *et al.*, 1973). El nombre *rotavirus* proviene del latín *rota* que significa “rueda” y fue propuesto en base a su morfología (Flewett *et al.*, 1974). La partícula infecciosa completa es también llamada “partícula de triple capa” (TLPs) debido a su estructura (Settembre *et al.*, 2011).

### 2.1. Estructura viral

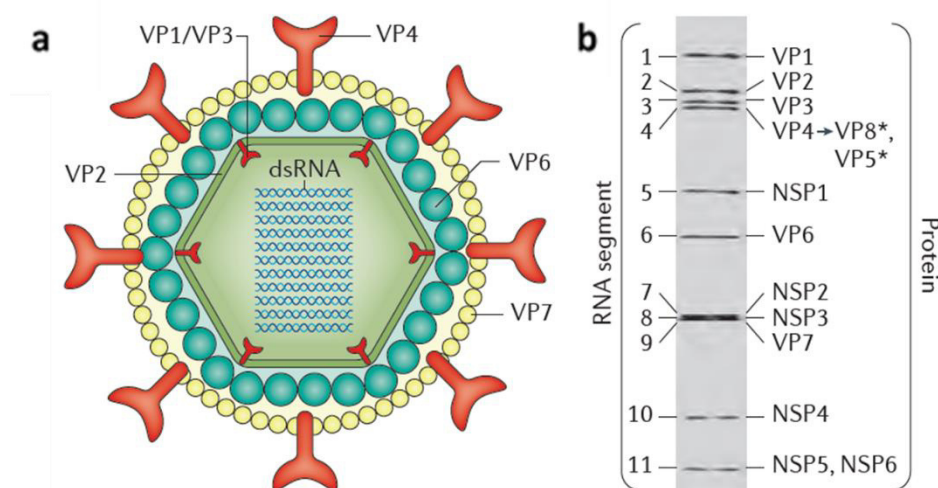
Rotavirus es un virus icosaédrico, sin envoltura, que mide aproximadamente 70 nm de diámetro y pertenece a la familia *Reoviridae*. Contiene un genoma de 18 kpb de ARN de doble cadena fraccionado en 11 segmentos. Cada segmento codifica para una proteína, excepto el segmento 11 que en algunas cepas codifica para 2 proteínas no estructurales distintas (NSP5 y NSP6). Seis de los segmentos de ARN codifican proteínas estructurales virales (VP) que se integran en el virión y los otros 5 segmentos codifican para proteínas no estructurales (NSP) (Figura 1) (M. K. Estes y Greenberg, 2013; McClain *et al.*, 2010; O’Ryan, 2011).

Rotavirus se compone de tres capas concéntricas que recubren el genoma (Figura 1). Una capa interna constituida por la de proteína VP2 que rodea al genoma viral y a las proteínas



VP1 y VP3, una capa media conformada por la proteína VP6 y una capa externa formada por la proteína VP7 y VP4, esta última se proyecta hacia el exterior en forma de espículas.

Las proteínas de la cápside externa poseen antígenos de neutralización y desempeñan un papel importante en la entrada del virus a los enterocitos (Aoki *et al.*, 2009; M. K. Estes y Greenberg, 2013). En el intestino, las proteasas tipo tripsina escinden la proteína VP4 en 2 polipéptidos, VP8\* y VP5\*. El polipéptido VP8\* forma la cabeza de la espícula, mientras que el VP5 forma el tallo y la base de esta proteína. Ambos polipéptidos contienen epítomos neutralizantes expuestos a la superficie (Dormitzer *et al.*, 2004; Kovacs-Nolan *et al.*, 2003).



**Figura 1. Conformación estructural de rotavirus.** a. Partícula de triple capa indicando la distribución proteica. b. Migración electroforética de los 11 segmentos de ARN de doble cadena de rotavirus (Crawford *et al.*, 2017).

En base a la similitud entre estructura, organización del genoma y estrategia de replicación, *rotavirus* es un género separado dentro de la familia *Reoviridae*. Este género incluye nueve especies en base a la reactividad de la VP6. En el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) se distinguen 9 especies (designadas de la A a la I). Las especies A, B, C y H causan enfermedades en humanos y animales, siendo rotavirus A (RVA) responsable de más del 90% de todas las infecciones en humanos. Por otro lado, las especies D, E, F, G e I, solo se han encontrado en animales (Esona y Gautam, 2015; Matthijnssens *et al.*, 2012).

## 2.2. Ciclo replicativo.

El tropismo celular natural para rotavirus es el enterocito en el intestino delgado. Esto sugiere que estas células expresan receptores específicos para la adhesión y la penetración del virus. Sin embargo, la diseminación extraintestinal de rotavirus también se ha observado en humanos y animales. Encontrándose rendimientos máximos del virus en cultivos celulares derivados de riñón de mono (M. K. Estes y Greenberg, 2013).

El reconocimiento celular de rotavirus involucra la interacción con receptores tales como integrinas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha x\beta 2$ ,  $\alpha v\beta 3$  y con la proteína hsc70 (López y Arias, 2004). Para las etapas de adhesión y penetración se proponen dos mecanismos: vía endocitosis o penetración directa (Settembre *et al.*, 2011).

La proteína VP4 proporciona infectividad al virus y es potenciada por la acción de proteasas tipo tripsinas, que dan lugar a VP5\* y VP8\*. La adhesión y subsecuente penetración de rotavirus son dadas por la proteína VP8\* y VP5\* respectivamente. Estas proteínas permiten la adecuada interacción con los distintos receptores y dan lugar a la penetración mediante una serie de eventos en donde se ve involucrada la alteración de la cápside externa (Contin *et al.*, 2011; Settembre *et al.*, 2011).

Una vez que rotavirus logra acceder al citoplasma de la célula mediante la formación de una vesícula endocítica, la disminución de las concentraciones de calcio desencadena cambios conformacionales con la subsecuente solubilización de la cápside, dando lugar a una partícula de doble capa (DLP) conformada por la proteína VP6 como cubierta externa (Cheung *et al.*, 2010).

La síntesis de transcritos virales es mediada por un complejo de ARN polimerasa dependiente de ARN viral endógeno que es necesario para la síntesis del ARNm para ser traducido en las proteínas necesarias para la formación de la unidad de ensamblaje inicial y nuevas partículas virales de doble capa (Hu *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2010). Después, comienza a darse la formación del viroplasma, conformado por la acumulación de proteínas virales (VP1-3, VP6, NSP2, NSP5 y en algunos casos NSP6) y material genético recién sintetizado. Las proteínas NSP2 y NSP5 son de las principales proteínas asociadas a esta formación (Carreño-Torres *et al.*, 2010). Dentro de los viroplasmas ocurre el ensamblaje de las nuevas partículas víricas. Sin embargo, VP4 y VP7 se encuentran en el

retículo endoplásmico después de su producción, es por eso que las partículas deberán llegar a este organelo para la maduración completa del virus (M. K. Estes y Greenberg, 2013).

Una vez dada la maduración, los virus son liberados hacia el lumen intestinal, generando la lisis de la célula hospedera y siendo capaces de infectar enterocitos sanos y repetir el ciclo.

### **2.3. Patogénesis.**

La patogénesis de rotavirus depende de diversos factores tanto virales, como del huésped, y ambos afectan el resultado de la infección. El factor del huésped más evidente que afecta el resultado clínico es la edad (Greenberg y Estes, 2009). Como resultado de la protección mediada por transferencia transplacentaria de anticuerpos maternos, los niños menores o iguales a 3 meses de edad, rara vez presentan enfermedad sintomática (Ray *et al.*, 2007), excepto en niños inmunocomprometidos (M. K. Estes y Greenberg, 2013). La edad en la que el título de anticuerpos maternos se reduce, corresponde a la edad más común en que los niños presentan exposición máxima al rotavirus, que es entre 3 y 24 meses de edad. (Greenberg y Estes, 2009).

Una vez dada la infección, rotavirus inicia con el ciclo de replicación desencadenando la lisis celular y atrofiamiento de las microvellosidades, causando así una disminución de la capacidad de absorción a nivel intestinal. Esto estimula la actividad secretora de enterocitos ocasionando un aumento en la excreción de agua y electrolitos (M. K. Estes y Morris, 1999; Moon, 1994). Se han identificado mecanismos de patogenicidad como la actividad de enterotoxina de la proteína NSP4 que se produce en la fase inicial del ciclo de replicación viral (Ball *et al.*, 1996) así como la activación del sistema nervioso entérico (SNE). Ambos mecanismos producen diarrea sin producir alteraciones histopatológicas. La NSP4 altera homeóstasis del calcio, que activa canales de cloro y estimula la secreción de éste y de agua hacia la luz intestinal. El SNE controla movimientos del intestino y la secreción de líquidos produciendo así la diarrea secretora (Lundgren *et al.*, 2000).

Aunque el intestino delgado es claramente el sitio de replicación viral óptimo, varios estudios han demostrado que puede producirse una viremia y una replicación sistémica

limitada en una variedad de sitios (Karampatsas *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018; Ramig, 2007).

#### **2.4. Expresión de citocinas durante infección viral.**

Durante la internalización de rotavirus a la célula, los componentes virales pueden exponerse y reconocerse mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como receptores tipo toll (TLRs) y receptores intracelulares como RIG-I, MDA-5 y NOD-2 (Figura 2). Los TLR tienen ectodominios N-terminales (ECD) que reconocen moléculas del virus. Los ECD están compuestos por repeticiones en tándem ricas en leucina (LRR) formando distintas estructuras específicas para cada ligando (Bell *et al.*, 2003; Botos *et al.*, 2011).

Existen TLRs endosomales tales como TLR3, TLR7/TLR8 los cuales reconocen ARNdc y ARNcs de rotavirus respectivamente (Xu *et al.*, 2009). Con la activación de cada tipo de receptor se desencadenan vías de señalización específicas (Lambotin *et al.*, 2010).

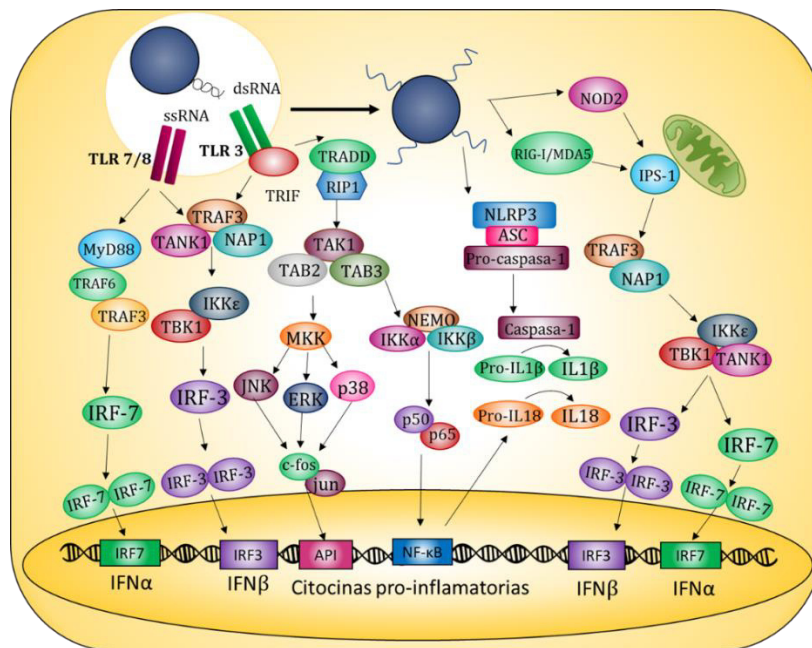
La activación del TLR3 inicia con el reclutamiento de TRIF y la subsecuente activación de TRAF3 (Hemmi y Akira, 2005; Yamamoto *et al.*, 2002). A su vez, TANK es reclutado por TRAF3 e interactúa con las quinasas TBK1 e IKK $\epsilon$  (Hemmi *et al.*, 2004; Kawai *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2006). Finalmente, TBK1 e IKK $\epsilon$  interactúan a través de sus extremos carboxilo con NAP1 (K. Clark *et al.*, 2011). Esta vía de señalización activa IRF-3 e IRF-7 para expresar algunas de las citocinas proinflamatorias, así como IFN- $\beta$  e IFN- $\alpha$  (K. Clark *et al.*, 2011; Saha *et al.*, 2006). Por otra parte, TRIF también es capaz de reclutar a TRADD y recluta a RIP1 que se une a una región de TRIF. Subsecuentemente, se inicia la ruta dependiente de TAK-1 que finaliza con la activación de IKK $\alpha/\beta$  y la translocación al núcleo de NF $\kappa$ B induciendo la expresión de diversas citocinas (Blackwell y Christman, 1997; Meylan *et al.*, 2004).

La activación de TLR7/8 de igual manera desencadena vías de señalización dependientes de una proteína adaptadora MyD88. A su vez, MyD88 forma complejos con distintas cinasas IRAK-4 e IRAK-1 que subsecuentemente activan a los factores TRAF6 y TRAF3. Por otro lado, la activación de TLR7/8 también puede activar la vía de señalización desencadenada por TLR3 independiente de la proteína adaptadora MyD88. Ambas vías

de señalización, finalmente dan lugar a la activación de IRF-3 e IRF-7 que inducen a la producción de IFN tipo I (Lester y Li, 2014).

Por otra parte, existen receptores citoplasmáticos capaces de reconocer partículas virales, como los receptores NOD, RIG-1 y MDA5. Estos receptores citoplasmáticos son capaces de reconocer ARN de doble cadena (Kato *et al.*, 2006). Una vez que estos receptores reconocen a su respectivo ligando, interactúan con IPS-1 mediante un dominio en común. A su vez, IPS-1 recluta a TRAF3 y éste interactúa con TANK, TBK1 y IKK $\epsilon$  (Hemmi *et al.*, 2004; Kawai *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2006). Finalmente esta señalización activa NF $\kappa$ B, IRF-3 y IRF-7 que da lugar a la expresión de citocinas pro-inflamatorias (K. Clark *et al.*, 2011; Saha *et al.*, 2006).

Otro de los receptores citoplasmáticos son los NLR, dentro de esta familia de receptores existe el NLRP3 el cual, al ser activado por proteínas virales, se acopla a ASC y a la pro-caspasa 1 mediante los dominios CARD formando un complejo llamado inflamasoma (Mariathasan *et al.*, 2004). Una vez formado el complejo, la pro-caspasa 1 es escindida a su forma activa de caspasa (Kanneganti *et al.*, 2006). A su vez, la caspasa-1 escinde a la pro-IL-1 $\beta$  y a la pro-IL-18 a su forma activa IL-1 $\beta$  e IL-18 respectivamente (Van de Veerdonk *et al.*, 2011).



**Figura 2. Producción de citocinas a través de la activación de receptores ante la infección con rotavirus.** La internalización de rotavirus a la célula desencadena la activación de distintos PRRs mediante el reconocimiento de patrones moleculares virales, esta activación desencadena diversas vías de señalización que finalmente activan la expresión de diferentes citocinas.

La activación simultánea de las distintas vías de señalización inducen la transcripción del ARNm de diversas citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 (Rollo *et al.*, 1999), TNF- $\alpha$ , IL-8, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  (Holloway y Coulson, 2013; Liu *et al.*, 2009), IL-18, IL-12, IL-6, IL-2 (Mogensen y Paludan, 2001). Estas citocinas se han visto implicadas en la activación de la respuesta inmune mediando procesos de inflamación y de activación celular.

## **2.5. Citocinas en la activación de la respuesta inmunológica.**

Las citocinas actúan como una red de comunicación celular para iniciar la respuesta de defensa ante diversos estímulos (Figura 3). Uno de los procesos iniciales mediado por la acción de las citocinas es el proceso inflamatorio. Dicho proceso forma parte importante en la inmunidad innata y es mediado por la acción de diversas citocinas como la Interleucina 1 (IL-1) que es reconocida por los mastocitos e induce la producción de histamina, misma que actúa como vasodilatador y ocasiona un aumento en la permeabilidad de la membrana de células epiteliales de los vasos sanguíneos (Di Paolo y Shayakhmetov, 2016). La acción de vasodilatador también pertenece al TNF- $\alpha$  (Holloway y Coulson, 2013), el cual induce la expresión de iNOS (Zelová y Hošek, 2013). Para este proceso de inflamación también es importante la acción de la interleucina 8 (IL-8) o quimiocina CXCL8 que actúa como quimioatrayente de neutrófilos al sitio de la infección, los cuales son capaces de hacer diapédesis por el aumento de permeabilidad (Cotton, 2016).

Los interferones tipo I, como IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  actúan de forma autocrina y paracrina al ser reconocidos por los receptores IFNAR. Dichos receptores iniciar una cadena de señalización que finalmente induce la expresión de proteínas capaces de interferir en la replicación viral (López *et al.*, 2016). Este tipo de citocinas también participan en la maduración y mantenimiento de células dendríticas (CD). Se ha demostrado que en presencia de IFN tipo I no se requiere estimulación por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) directa para la maduración de las CD. Además, los IFN tipo I inducen la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) promoviendo así la presentación de antígeno (Pantel *et al.*, 2014). Por otro lado, actúan sobre células asesinas naturales (NK) por medio de la activación de STAT 4 promoviendo

a su vez, la expresión de IFN- $\gamma$  que contribuye en la activación de macrófagos (Mack *et al.*, 2011).

La Interleucina 18 (IL-18) participa en la activación y maduración de las CD, ya que desencadena una vía de señalización a través del TRAF6, induciendo la expresión de CD11b+ y generando una fuerte actividad presentadora de antígeno (Ito *et al.*, 2006). En conjunto, la IL-18, los IFN tipo I y el reconocimiento PAMPs por medio de los PRR, inducen a la activación de las células dendríticas. A su vez, las CD activadas son capaces de producir citocinas como la IL-12, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y IFN- $\alpha$ , que también ejercen su acción en otras células del sistema (e Sousa, 2004; Kapsenberg, 2003).

La IL-18 también participa en la activación de células NK y actúa sinérgicamente con la IL-12 (Freeman *et al.*, 2015) estimulando la expresión de moléculas CD25 y CD69 promoviendo su proliferación y la citotoxicidad respectivamente. Una vez activadas, las NK son capaces de reconocer proteínas virales expresadas en la célula infectada y mediante la unión de FasL con Fas, se induce la apoptosis para la posterior eliminación de la célula infectada (Clausen *et al.*, 2003). De la misma manera las NK activadas son capaces de producir citocinas tales como IL-12, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$ .

El TNF- $\alpha$  actúa sobre los macrófagos, sin embargo, es necesaria la participación del IFN- $\gamma$  para conferirle la citotoxicidad necesaria y llevar a cabo su acción. La fagocitosis es mediada por ambas citocinas, que estimulan la producción de aniones superóxido y radicales de oxígeno y nitrógeno (Mosser y Edwards, 2008). Una vez que los macrófagos han sido activados, producen citocinas como IL-1, IL-6, IL-23, IL-12, IL-27 y TNF- $\alpha$ , que actúan en la diferenciación de diversas células T cooperadoras (Striz *et al.*, 2014).

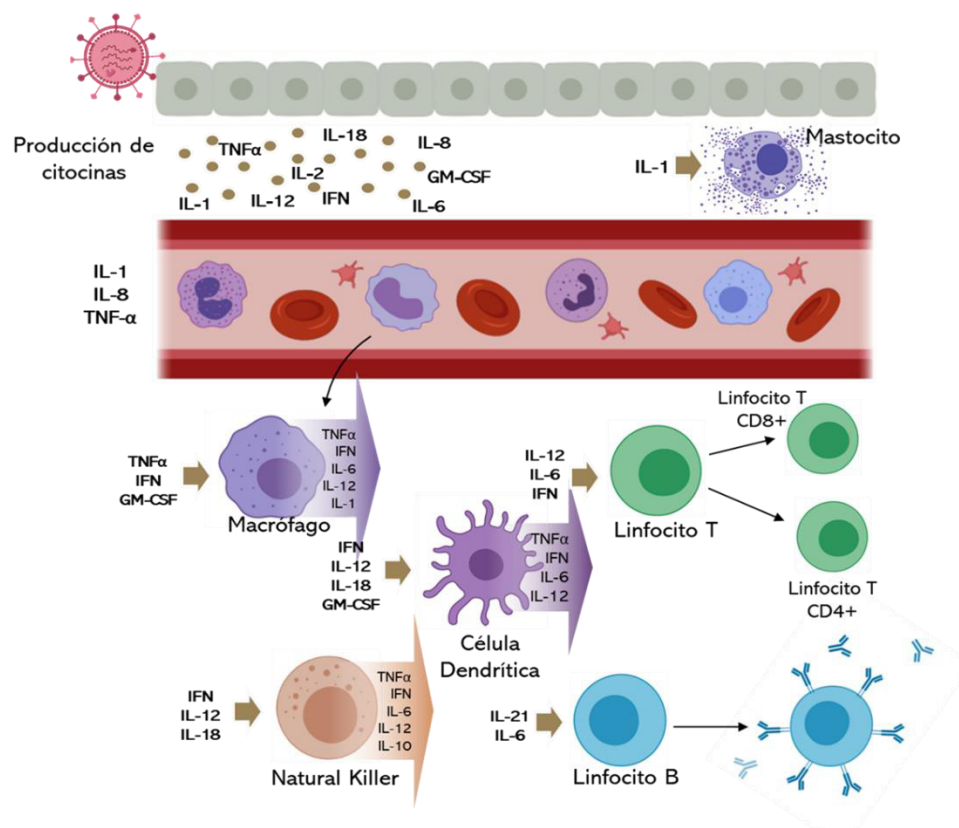
Así como las citocinas participan en la activación y mantenimiento de la respuesta inmune innata, las células activadas tienen la capacidad de expresar diversas citocinas que inducen la respuesta inmune adaptativa, así como producir las mismas citocinas para mantener activa esa respuesta inmune.

La interleucina 6 (IL-6) promueve la diferenciación de Linfocitos T citotóxicos. Los LTC inducen la muerte a las células infectadas, mediante la sinapsis inmunológica liberando sustancias como la perforina que finalmente lleva a lisis osmótica de la célula blanco (Tanaka *et al.*, 2014). Otra función asociada a esta citocina es la diferenciación de células Th17, lo cual sucede de forma sinérgica con la interleucina 23, esta diferenciación es mediante la producción de ROR $\gamma$ t. Las células Th17 favorecen la respuesta inflamatoria y el reclutamiento de neutrófilos (Sánchez, 2011), a través de la expresión de citocinas como la IL-17 y la IL-22. Además, la IL-6 promueve la proliferación de células B mediante su unión a un complejo de receptores (gp80, CD126 y CD130) (Friederichs *et al.*, 2001). Finalmente, estimula diferenciación de células plasmáticas mediante la expresión de la molécula CD27, generando la producción de anticuerpos (Hilbert *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 2013)

La IL-12 promueve la diferenciación de las células Th1, por la expresión de T-bet. Dichas células activan a los macrófagos mediante la expresión de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , que amplifican la respuesta inmune producida. (Placek *et al.*, 2009; Owen *et al.*, 2013)

La Interleucina 2 participa en la diferenciación y proliferación de células Th2 y Treg a través de la expresión de moléculas como GATA3 y FOXP3 respectivamente (Cote-Sierra *et al.*, 2004; Zhu y Paul, 2009). Estas células tienen función reguladora de la respuesta inmune, ya que expresan diversas citocinas como la IL-10, IL-6, IL-4, IL-13 y TGF- $\beta$ . Estas son conocidas por sus acciones inmunomoduladoras, y antiinflamatorias, activando a los macrófagos tipo 2 (M2), que de igual forma tienen función reguladora, ya que sintetizan más cantidades de IL-10 y TGF- $\beta$  (Striz *et al.*, 2014).





**Figura 3.** Efecto de citocinas expresadas por células infectadas con virus, en la activación de células inmunológicas.

La participación que tienen las citocinas como el IFN- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  en la activación de la respuesta inmunológica contra la infección viral es de suma importancia. Asimismo, el IFN- $\beta$  tiene la capacidad de inducir la producción de proteínas con propiedades antivirales.

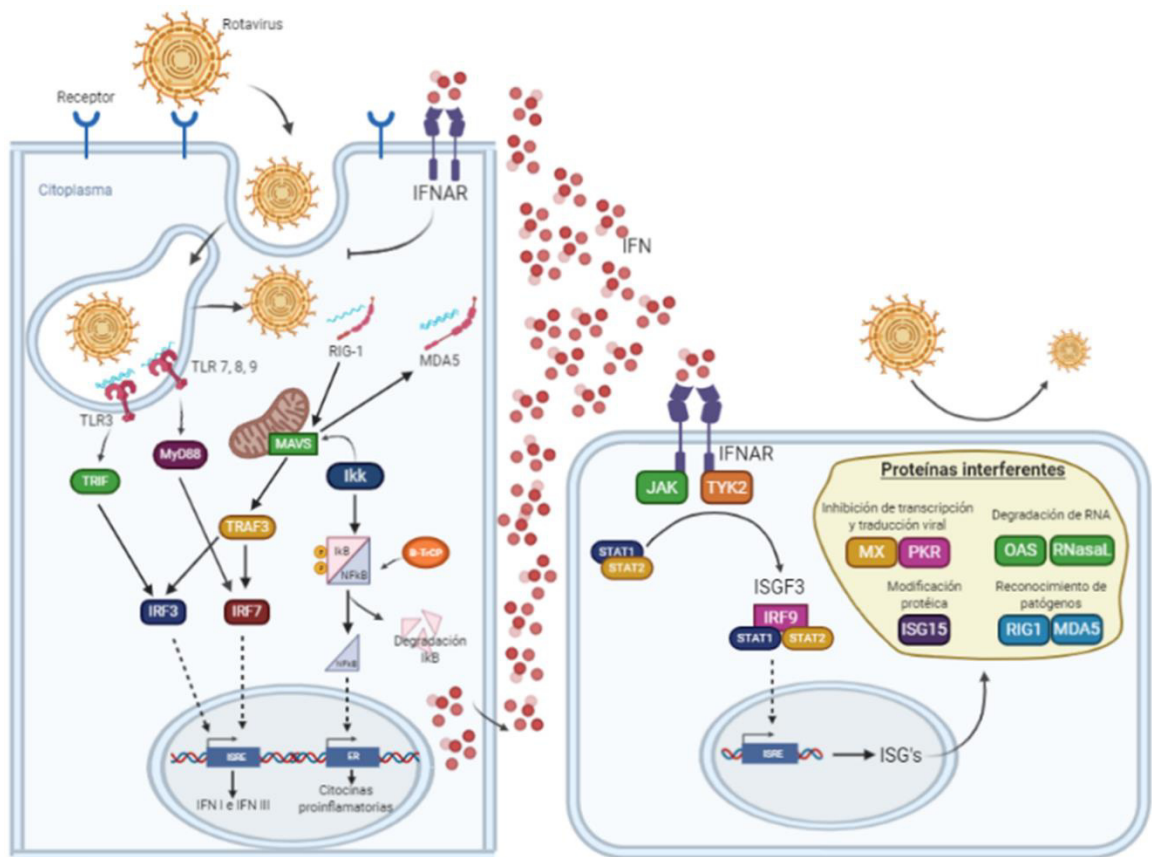
## 2.6. Efecto antiviral de citocinas.

Además de la acción que ejercen las citocinas en la activación de la respuesta inmunológica mediante activación de células de origen hematopoyético, diversos estudios demuestran el efecto antiviral que pueden ejercer algunas citocinas directamente en la replicación del virus (Ho *et al.*, 1985; Robek *et al.*, 2005; Van Campen, 1994).

Existen diversos estudios *in vivo* donde la actividad antiviral de diversas citocinas es evidente (Gandhi *et al.*, 2017). Sin embargo, los estudios *in vitro* libres de un sistema de células inmunológicas, ayudan a dilucidar los mecanismos de defensa generados por las propias células propensas a una infección viral. Asimismo, este tipo de estudios ayuda a

tener una mejor visión acerca del panorama de la replicación viral y de los cambios que esta ejerce en la función celular.

De las citocinas más estudiadas en la inhibición de la replicación viral son el IFN tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y tipo III ( $\lambda$ ) (Randall y Goodbourn, 2008). Estas citocinas son producidas por células infectadas con virus y actúan de forma autocrina y paracrina mediante la interacción con sus respectivos receptores celulares (Kotenko *et al.*, 2003). A su vez, los receptores activados, inician vías de señalización que promueven la transcripción de genes estimulados por IFN (ISGs). Dicha transcripción, codifica para diversas proteínas que actúan directamente para restringir la replicación viral. Algunas de ellas actúan degradando material genético de los virus o actúan inhibiendo procesos como la transcripción y traducción y otras proteínas que pertenecen a familias de receptores citoplasmáticos (Schoggins y Rice, 2011; Sharma *et al.*, 2003).



**Figura 4.** Efecto antiviral generado por la expresión y el reconocimiento de IFN tipo I y tipo III inducido por una infección viral.

Otra citocina que desde hace años ha demostrado tener un efecto antiviral *in vitro* es el TNF- $\alpha$  (Mestan *et al.*, 1986; Wong *et al.*, 1988). Sin embargo, no es posible generalizar dicho efecto, ya que la respuesta celular ante una infección puede variar según el agente viral. En los últimos años, TNF- $\alpha$  recombinante ha mostrado un efecto antiviral ante influenza, rotavirus, entre otros (M. S. Hakim *et al.*, 2018; Seo y Webster, 2002). El mecanismo por el cual actúa el TNF- $\alpha$  aún no está del todo esclarecido. Sin embargo, algunos estudios proponen que el TNF es reconocido por los receptores TNFR1 y TNFR2 y se da la activación de la vía de señalización clásica de NF- $\kappa$ B (independiente de la producción de IFN) y por la actividad de la vía JAK-STAT (M. S. Hakim *et al.*, 2018; Ruby *et al.*, 1997).

Este tipo de estudios han ayudado a dilucidar también acerca de los mecanismos de evasión generados por los virus, entre estos mecanismos se encuentra la modulación de la producción de citocinas mediante el bloqueo de las vías de señalización (Alcami y Koszinowski, 2000).

Rotavirus ha desarrollado mecanismos de inhibición de la respuesta del IFN mediante la acción de la NSP1 (Dunn *et al.*, 1994). La interacción de esta proteína con el IRF3 (Graff *et al.*, 2002) dio lugar a investigar el mecanismo de acción, descubriendo que se induce a la degradación de diversos IRF como IRF3, IRF5, IRF7 e IRF9 (Arnold *et al.*, 2013; Barro y Patton, 2007). Este mecanismo ha sido observado con diversas cepas de rotavirus animal (Arnold *et al.*, 2013). Por otro lado, la NSP1 de cepas de rotavirus humano y porcino, bloquea la expresión de IFN mediante la degradación de  $\beta$ -TrCP, una ligasa que es esencial para la activación de NF $\kappa$ B (Graff *et al.*, 2009; Morelli *et al.*, 2015). En base a las distintas vías de señalización, sin la activación de esta proteína, no sólo la producción de IFN se puede ver afectada, sino también la producción de diversas citocinas proinflamatorias.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

A pesar de la implementación de vacunas preventivas contra rotavirus, las mutaciones constantes de este virus permiten que siga siendo uno de los principales agentes etiológicos de la gastroenteritis en infantes menores de 5 años. Las células infectadas con rotavirus expresan citocinas capaces de activar el sistema inmunológico como mediador en el control de la infección. Por otro lado, citocinas actúan de manera directa inhibiendo la replicación viral en un sistema libre de células inmunes. Sin embargo, aún se desconoce la actividad antiviral directa de las citocinas expresadas por las células infectadas con rotavirus. Por lo que es de suma importancia evaluar dicho efecto para ofrecer más información acerca de los mecanismos virales y celulares que puedan contribuir a la búsqueda de alternativas contra la infección.

#### **4. HIPÓTESIS**

Células MA-104 infectadas con rotavirus expresan citocinas con actividad antiviral.

## **5. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto antiviral de citocinas expresadas por células MA-104 infectadas con rotavirus.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar niveles de expresión de IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  producidas en células MA-104 en distintos tiempos de infección con rotavirus.
2. Determinar el efecto antiviral de IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en la multiplicidad viral de rotavirus en células MA-104.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Subcultivo celular.**

Células MA-104 confluentes contenidas en un frasco de 25 cm<sup>2</sup> fueron lavadas con 2 ml de buffer EDTA 0.68 mM, posteriormente se retiró el EDTA con una pipeta Pasteur y se añadieron 500 µl de Tripsina al 0.25% hasta cubrir todas las células para un correcto desprendimiento del frasco. Una vez que las células se observaron redondeadas, la reacción enzimática fue detenida agregando 2 ml de medio de cultivo D-MEM suplementado con 3% de suero fetal de bovino (SFB) y 1% de L-Glutamina. Se tomó 300 µl de la suspensión de células y se adicionó en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> estéril con 4 ml de medio D-MEM suplementado con SFB 3%. Las células transferidas fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> alrededor de 96 horas.

### **6.2. Propagación de la cepa Wa de rotavirus en células MA-104.**

Se activó 200 µl de lisado de rotavirus con 1 µl de Tripsina 1% mezclando suavemente y se incubó por 30 minutos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se lavaron células MA-104 confluentes por duplicado con 2 ml PBS A 1X y se adicionó el lisado de virus activado anteriormente. Se incubaron durante una hora en condiciones antes mencionadas con intervalos de movimientos suaves cada 10 minutos. Posteriormente, se añadió medio MEM suplementado con L-Glutamina y HEPES. Finalmente, se incubó en un periodo de 8-48 horas. Los lisados fueron cosechados con 3 ciclos de congelación y descongelación de 15 minutos en distintos tiempos de infección (8, 12, 24, 36 y 48 horas).

### **6.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS**

Alícuotas de los distintos tiempos de infección fueron corridos en un gel de poliacrilamida con SDS discontinuo. Se preparó un gel separador al 12% y un gel concentrador al 4%. Una vez polimerizado, 40 µl de cada muestra fueron mezclados con 20 µl de Buffer de carga y la mezcla se calentó a 95°C por 5 minutos. Posteriormente se depositó 13 µl por pozo y la electroforesis se corrió a 20 mA hasta que el indicador estuviera al término del gel. Finalmente, el gel fue teñido con azul de Coomassie.

#### **6.4. Dot-Blot**

Se aplicaron 5 µl de cada alícuota en papel de nitrocelulosa para retener las proteínas de la muestra. Se bloquearon los sitios libres con TBS-Tween 0.05%-Albúmina 0.1%. Para determinar la presencia de la proteína viral, se utilizó un Anticuerpo anti-VP8\* diluido 1:500. Posteriormente, se utilizó proteína A unida a peroxidasa de rábano 1:1,500. Una vez adicionado el sustrato (fosfatasa alcalina), la reacción colorimétrica fue detenida con agua bidestilada.

#### **6.5. Extracción de ARN**

Durante todo el proceso de extracción se mantuvieron las muestras en hielo. Se recuperó 500 µl de cada una de las alícuotas y se mezcló con 500 µl de Trizol en tubos cónicos de 1.5 ml. La mezcla se agitó en vortex y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se adicionaron 100 µl de Cloroformo, se agitó en vortex y se incubó en hielo durante 3 minutos. La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 15 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo cónico de 1.5 ml nuevo. Se adicionó 400 µl de Isopropanol, se mezcló y se mantuvo a -20°C durante 24 horas. Se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se retiró el isopropanol hasta dejar aproximadamente 50 µl de la mezcla. Posteriormente, se añadió un mililitro de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 7 minutos. Se realizó el mismo procedimiento con etanol absoluto al 75%. Una vez centrifugado se retiró todo el alcohol y se dejó secando en la campana de extracción durante 20 minutos. Una vez volatilizado todo el alcohol, el ARN precipitado se resuspendió en 20 µl de agua nanopura estéril. Finalmente se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

#### **6.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida de ARN de rotavirus**

Se realizó un gel de poliacrilamida al 10%. Se tomó 3 µl del ARN extraído de cada muestra, y se mezcló con 2 µl de Azul de Bromofenol. El gel se corrió a 140 V por 6 horas y finalmente, fue teñido con nitrato de plata.

#### **6.7. Transcripción reversa**

El ARN extraído se sometió a una transcripción inversa con la enzima transcriptasa reversa del virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV *Reverse Transcriptase*®, PROMEGA) para la obtención del ADN complementario (cDNA). Se utilizaron los



oligonucleótidos antisentido de cada uno de los genes especificados en la **Tabla 1**. El protocolo de reacción se ajustó a un volumen final de 25 µl en tubos de microcentrífuga de 0.2 ml (Tabla 2).

**Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para cada gen a amplificar.**

Gen	Dirección	Secuencia	Tm	Pb
IFN-β	Sentido	5'- GGACAGGATGAACTTTGAC-3'	50°C	180
	Antisentido	5'- TGATAGACATTAGCCAGGAG-3'		
TNF-α	Sentido	5'-TCTGTCTGCTGCACTTTGGAGTGA-3'	54°C	149
	Antisentido	5'-TTGAGGGTTTGCTACAACATGGGC-3'		
18S	Sentido	5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3'	50°C	1096
	Antisentido	5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3'		

Tm: Temperatura de alineación. Pb: pares de bases del producto.

**Tabla 2. Condiciones por reacción de retrotranscripción.**

Reactivo	Concentración Final	Volumen por reacción
Agua Nanopura		9.75 µl
ARN	~40 ng/µl	5 µl
Oligonucleótido antisentido 25µM	3 µM	3 µl
dNTPs 10mM	0.5 mM	1.25 µl
Buffer RT 5X	1 X	5 µl
Retrotranscriptasa	8 U/µl	1 µl
Volumen final de reacción:		25 µl

La mezcla se colocó en un termociclador bajo el siguiente programa: 95°C por 5 minutos, 42°C durante una hora y 94°C durante 2 minutos. Al finalizar la reacción, el cDNA se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

### **6.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.**

El cDNA obtenido se sometió a una PCR punto final para la obtención del cada uno de los productos amplificados. Se utilizaron los oligonucleótidos de cada gen especificados en la tabla 3. El protocolo de reacción se ajustó a un volumen final de 25 µl en tubos de microcentrífuga de 0.2 ml (Tabla 3).

**Tabla 3. Condiciones por reacción de PCR punto final.**

Reactivo	Concentración Final	Volumen por reacción
Agua nanopura		15.15 µl
Buffer 10X	1 X	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.5 mM	0.75 µl
dNTPs 10mM	0.2 µM	0.5 µl
Oligonucleótido sentido 10µM	0.2 µM	0.5 µl
Oligonucleótido antisentido 10µM	0.2 µM	0.5 µl
cDNA		5 µl
DNA Taq Polimerasa	0.8 U/µl	0.1 µl
Volumen final de reacción:		25 µl

La mezcla se colocó en un termociclador bajo el siguiente programa: 94°C por 2 minutos, (94°C 30 segundos, T<sub>m</sub> 30 segundos y 72°C un minuto) 30 ciclos. Al finalizar la reacción y para el análisis de resultados, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 100 V constantes por 60 minutos. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio durante 15 min y revelado con luz ultravioleta en un transiluminador.

### **6.9. Purificación de productos de PCR.**

Los productos obtenidos de la PCR fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa *Low Melting* 1.5% durante 60 minutos a 100 V. Para visualizar las bandas, el gel fue teñido con bromuro de etidio y utilizando transiluminador de baja intensidad se cortaron los fragmentos del producto a amplificar. Dichos productos se purificaron utilizando el Kit *WizardRSV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) para corroborar su correcta purificación, el producto purificado se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Finalmente, los productos purificados fueron mandados a secuenciación.

### **6.10. Análisis de secuencias.**

Las secuencias de nucleótidos obtenidas de ambos productos fueron analizadas en el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* v7.2.5 (Figura 10). Posteriormente, se realizó un análisis de identidad de las citocinas mediante el uso de la herramienta bioinformática BLAST *nucleotide* de NCBI (*Highly similar sequences*).

### 6.11. PCR tiempo real.

Para obtener los niveles de expresión relativa del IFN- $\beta$  y del TNF $\alpha$  en base a la expresión del control endógeno 18S se realizó una PCR en tiempo real utilizando el sistema *Power SYBR® Green PCR Máster Mix* (Applied Biosystems). La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 25  $\mu$ l y se realizó por triplicado bajo las condiciones especificadas en la Tabla 4.

**Tabla 4. Condiciones por reacción de PCR tiempo real.**

Reactivo	Concentración Final			Volumen por reacción		
	18S	IFN- $\beta$	TNF- $\alpha$	18S	IFN- $\beta$	TNF- $\alpha$
Agua nanopura				9.8 $\mu$ l	9.3 $\mu$ l	9.7 $\mu$ l
Máster Mix 2X	1 X			12.5 $\mu$ l		
Oligonucleótido sentido 25 $\mu$ M	100 nM	300 nM	150 nM	0.10 $\mu$ l	0.35 $\mu$ l	0.15 $\mu$ l
Oligonucleótido antisentido 25 $\mu$ M	100 nM	300 nM	150 nM	0.10 $\mu$ l	0.35 $\mu$ l	0.15 $\mu$ l
cDNA				2.5 $\mu$ l		
Volumen final de reacción:				25 $\mu$ l		

Se utilizó el equipo *7500 Real Time PCR system* (Applied Biosystems) para correr el siguiente programa: 95°C durante 10 minutos, 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto por 40 ciclos. Asimismo, se corrió programa para una curva de disociación.

### 6.12. Expresión relativa.

Para obtener la expresión relativa del IFN- $\beta$  y del TNF- $\alpha$  en base a la expresión del control endógeno 18S se utilizan los valores del ciclo umbral (CT) de cada una de las réplicas de los genes amplificados. En este caso, se utilizó como control las células sin infección, y como muestras las distintas horas post-infección. La expresión relativa se calcula con la siguiente fórmula:

$$ExpR = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

En la cual:

$$\Delta\Delta CT = (CT_{gbm} - CT_{gem}) - (CT_{gbc} - CT_{gec})$$

Donde:

CTgbm= Valor promedio del CT del gen blanco de la muestra.

CTgem= Valor promedio del CT del gen endógeno de la muestra.

CTgbc= Valor promedio del CT del gen blanco del control.

CTgec= Valor promedio del CT del gen endógeno del control.

Para representar los cambios en la expresión relativa de cada una de las muestras se utiliza el Log 2 de la expresión relativa obtenida. Asimismo, para el análisis estadístico se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, con un valor de significancia de  $p=0.05$ .

### **6.13. Interferencia viral.**

Para determinar si las células MA-104 infectadas con rotavirus producen sustancias que interfieran con la replicación del virus, se realizó un ensayo de interferencia en base a lo realizado por Isaacs y Lindenmann (Isaacs y Lindenmann, 1957). El ensayo consiste en realizar una infección primaria con distintos tipos de lisados de células infectadas, seguido de una infección secundaria con lisados con virus activado en las mismas células. Se realizó un subcultivo de células MA-104 en una placa de 6. Las células fueron lavadas por duplicado con 2 ml de PBS A 1 X. Posteriormente, se realizaron distintos tipos de infecciones primarias con la cepa Wa de rotavirus humano para cada uno de los pozos. El primer pozo no recibió infección primaria; el segundo, se infectó con 200  $\mu$ l de un lisado inactivado (incubación a 56°C por 1 hora); el tercero, se infectó con 200  $\mu$ l de un lisado sin tripsina; y el cuarto, se infectó con 200  $\mu$ l de un lisado activado con 1  $\mu$ l de tripsina 1% (incubación a 37°C por 30 minutos). Todos los lisados provenían de una misma infección. La placa fue incubada a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 60 minutos con intervalos de movimientos suaves cada 10 minutos. Posteriormente, se les añadió 2 ml de MEM suplementado con L-Glutamina y HEPES y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 8 horas. Al término de la incubación, las células fueron lavadas por duplicado con PBS A 1X. Para realizar la infección secundaria, todos los pozos fueron infectados con 200  $\mu$ l de lisado activado a 37°C por 30 minutos con 1  $\mu$ l de tripsina 1%. La placa fue incubada a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 60 minutos con intervalos de movimientos suaves cada 10 minutos. Posteriormente, se les añadió 2 ml de MEM suplementado con L-Glutamina y HEPES y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Los lisados fueron cosechados con 3

ciclos de congelación y descongelación durante 15 minutos. Para evaluar la interferencia se analizaron los cambios del efecto citopático observado en cada uno de los pozos después de la segunda infección. Asimismo, se realizó una microtitulación del virus por unidades formadoras de focos.

#### **6.14. Microtitulación de Unidades Formadoras de Focos.**

Para determinar las unidades formadoras de focos por mililitro en lisados celulares se realizó mediante tinción con inmunoperoxidasa. Alícuota de 350 µl de lisado celular, fue activada con 1 µl de tripsina 1% incubándose a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se prepararon 200 µl de las diluciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128 del virus activado en MEM sin suero. Por otro lado, se lavó dos veces con 200 µl de PBS A 1X una placa de 96 pozos con células MA-104 confluentes y después se adicionó 50 µl de cada dilución por duplicado. De igual forma, se incluyeron 2 pozos con 50 µl del virus sin diluir y 2 pozos sin virus como control negativo. Las células fueron incubadas a 37°C por una hora. Una vez pasado el tiempo de incubación, se retiró el inóculo y se lavó una vez con 200 µl de PBS A 1X. Después, se adicionó 150 µl de MEM sin suero. Posteriormente, la placa se incubó a 37°C por 13 horas. Se retiró el medio de cultivo, se lavó una vez con 200 µl de PBS A 1X y se fijaron las células adicionando 100 µl de Acetona 80%-PBS A 5 X, incubando 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó 2 veces con 200 µl de PBS A 1 X y se adicionó 75 µl de anti-Wa 1:3,000 en PBS A 1 X. La placa se incubó a 37°C por una hora. Se retiró el anticuerpo y se lavó 2 veces con 200 µl de PBS A 1X. Se adicionó 75 µl de Proteína A unida a Peroxidasa de rábano diluida 1:1,000. De igual forma, se incubó a 37°C por una hora y se lavó 2 veces con 200 µl de PBS A 1X y finalmente, se adicionó 75 µl de sustrato con carbazole. La placa se incubó a 37°C por 15 minutos en oscuridad y la reacción enzimática se detuvo lavando la placa con agua corriente 5 veces. El título de unidades formadoras de focos infecciosos se determinó en la dilución donde se contó entre 100 y 200 focos. El número de UFF/ml fue determinado con la siguiente fórmula:

$$\frac{UFF}{ml} = 20 \times 5.5 \times \text{Promedio de focos} \times \text{Dilución}$$

Donde:

20 = Objetivo 20X del microscopio invertido.

5.5 = Diámetro (mm) de un pozo de la placa 96 pozos.

Promedio = Se obtiene un promedio del número de focos de los dos pozos de cada dilución.

Dilución = Dilución donde se contó de 100-200 focos infecciosos

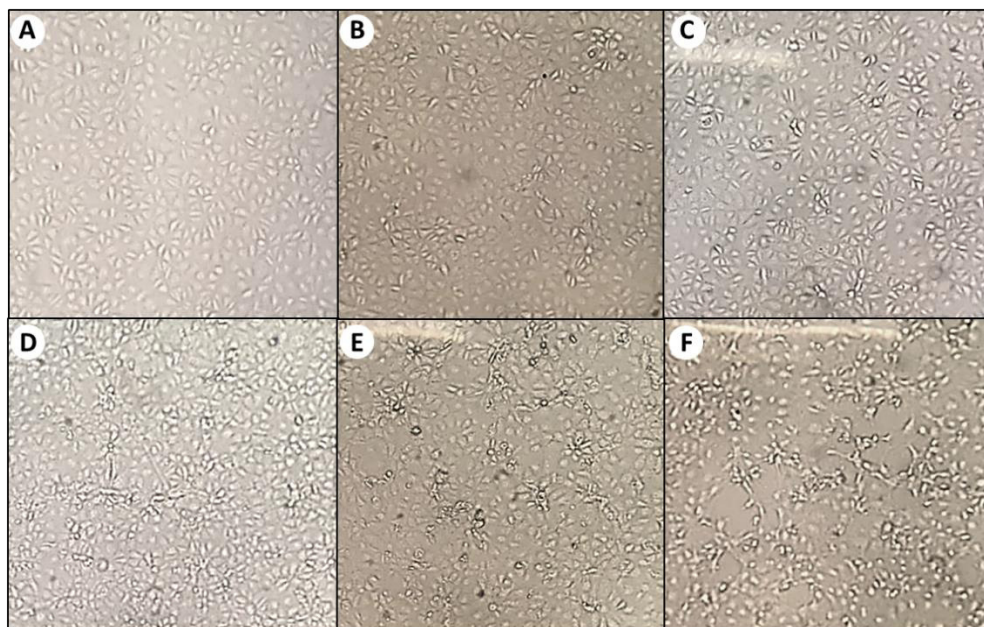
### **6.15. Silenciamiento génico.**

Para el ensayo de silenciamiento, se realizó una transfección de ARN de interferencia pequeño (siRNA) para silenciar el gen del IFN- $\beta$  y del TNF- $\alpha$ . Para esto, se realizó un subcultivo de células MA-104. Para la validación del ensayo se utiliza una mezcla únicamente con el agente de transfección y otra mezcla del mismo agente con cada uno de los siRNA o bien, la mezcla de estos siRNAs. Para realizar la mezcla de agente de transfección con siRNA se tomaron 10  $\mu$ l de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, corp.) y se mezcló con 250  $\mu$ l de Opti-MEM<sup>®</sup> I (GIBCO<sup>®</sup> Invitrogen corp.), se homogenizó por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. En otro tubo se homogenizó el volumen correspondiente a 200 pmoles de siRNA con 250  $\mu$ l de Opti-MEM<sup>®</sup> I. En el caso del silenciamiento simultáneo se utilizaron 100 pmoles de cada siRNA. Tanto la mezcla del agente de transfección como la de los siRNAs se combinaron en un solo tubo, esta nueva mezcla se homogenizó y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. De igual manera, para la mezcla del control, con únicamente el agente de transfección, se utiliza la misma cantidad de lipofectamine 2000 y de Opti-MEM. Se les adicionó las mezclas finales a las células subconfluentes. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 5 horas. Después de la incubación se les retiró el medio y se les adicionó medio nuevo. Una vez que las células alcanzaran confluencia del 90% se realizó la infección con rotavirus como lo indica el protocolo anterior.

## 7. RESULTADOS

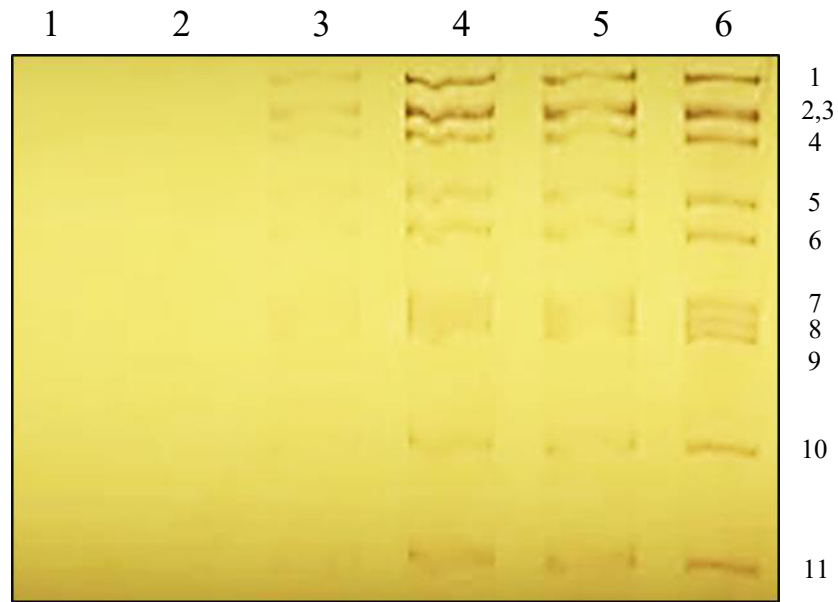
### 7.1. Propagación de la cepa de rotavirus Wa en células MA-104.

Células MA-104 fueron subcultivadas y posteriormente infectadas con la cepa prototipo Wa de rotavirus humano. Se evaluó el efecto citopático generado en distintos tiempos de infección (figura 5). El redondeamiento y la lisis celular, así como el desprendimiento de la monocapa, fueron aumentando de manera gradual con forme pasaban las horas post infección (h.p.i).



**Figura 5. Efecto citopático de rotavirus Wa en células MA-104.** A) Células sin infectar; B) Células a las 8hpi; C) Células a las 12hpi; D) Células a las 24hpi; E) Células a las 36hpi; F) Células a las 48hpi.

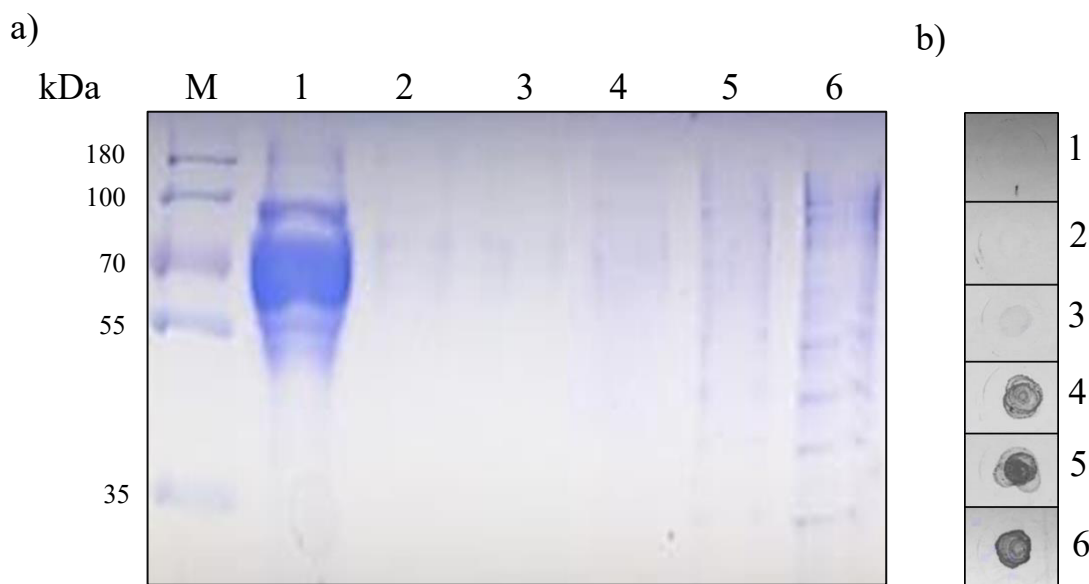
Para evaluar la presencia de rotavirus durante el proceso de infección, alícuotas de células sin infectar, así como de lisados fueron obtenidas a diferentes tiempos de infección. Las alícuotas fueron sometidas a una extracción de ARN. Posteriormente, se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida. El gel fue teñido con nitrato de plata, y se observaron patrones electroforéticos de los 11 segmentos de ARN característicos de rotavirus a partir de las 12 h.p.i. con un aumento en la intensidad de bandas en las horas posteriores (Figura 6).



**Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de ARN de rotavirus extraído de alícuotas celulares.** Carril 1: Células sin infectar; Carril 2: lisado a las 8hpi; Carril 3: lisado a las 12hpi; Carril 4: lisado a las 24hpi; Carril 5: lisado a las 36hpi; Carril 6: lisado a las 48hpi.

Para evaluar cambios en la producción de proteínas bajo el proceso de infección con rotavirus, las alícuotas fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en condiciones desnaturalizantes. El gel fue teñido con azul de Coomassie, lo que permitió observar las bandas pertenecientes a las proteínas de cada alícuota. Células sin infectar mostraron un patrón intenso de bandas, lo cual indica la presencia de proteínas en la muestra. Una notable disminución de proteínas se observó a las 8 h.p.i. A su vez, se observa un aumento gradual de proteínas desde las 12 h.p.i. hasta las 48 h.p.i. (Figura 7a). Ya que se observa un aumento en la producción de proteínas se sugiere que este cambio sea consecuencia de un aumento en la traducción de proteínas virales. Se realizó un inmunoensayo de punto (Dot-Blot) para determinar la producción de la proteína VP8\* de rotavirus. Los resultados muestran una producción de la proteína viral desde las 8 h.p.i. y un subsecuente aumento de esta (Figura 7b).

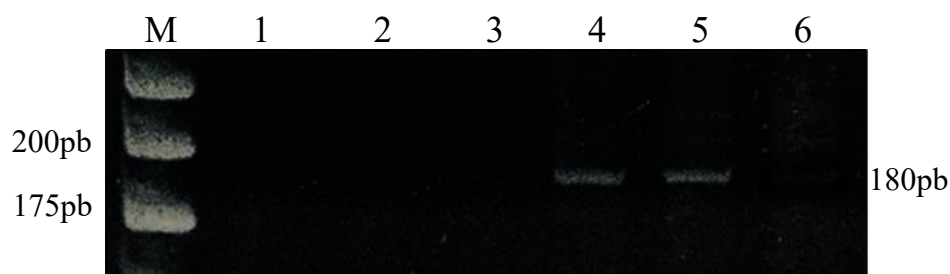




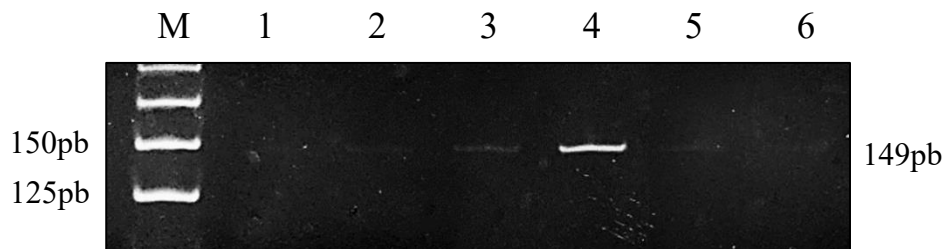
**Figura 7. Producción de proteínas de células MA-104 en distintos tiempos de infección con rotavirus.**  
a) Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de alícuotas de células MA-104 infectadas. b) Dot Blot de alícuotas de células MA-104 infectadas. M: Marcador de peso molecular; 1: Células sin infectar; 2: lisado a las 8hpi; 3: lisado a las 12hpi; 4: lisado a las 24hpi; 5: lisado a las 36hpi; 6: lisado a las 48hpi.

## 7.2. Expresión de IFN- $\beta$ y TNF- $\alpha$ en células MA-104 infectadas con rotavirus

A partir del ARN extraído de células sin infectar y de los lisados obtenidos en cada tiempo de infección, se realizó una reacción de RT-PCR para observar la expresión de IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$ . El producto amplificado de 180pb indica que la expresión de IFN- $\beta$  se obtuvo a partir de las 24 h.p.i. (Figura 8). A su vez, el producto de 149 pb correspondiente al TNF- $\alpha$  se expresó de manera gradual desde las 8 h.p.i. hasta las 24 h.p.i. con una disminución de la expresión a las 36 y 48 h.p.i. (Figura 9).

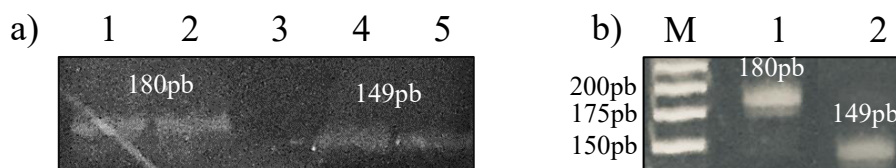


**Figura 8. Electroforesis de productos de RT-PCR de IFN- $\beta$  en gel de poliacrilamida.**  
M: Marcador de pares de bases (pb); Carril 1: Células sin infectar; Carril 2: lisado a las 8hpi; Carril 3: lisado a las 12hpi; Carril 4: lisado a las 24hpi; Carril 5: lisado a las 36hpi; Carril 6: lisado a las 48hpi.



**Figura 9. Electroforesis de productos de RT-PCR de TNF- $\alpha$  en gel de poliacrilamida.** M: Marcador de pares de bases (pb); Carril 1: Células sin infectar; Carril 2: lisado a las 8hpi; Carril 3: lisado a las 12hpi; Carril 4: lisado a las 24hpi; Carril 5: lisado a las 36hpi; Carril 6: lisado a las 48hpi.

Los productos fueron purificados con el *Kit WizardRSV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) (Figura 10a). Y se observaron los fragmentos purificados en un gel de poliacrilamida (Figura 10b).

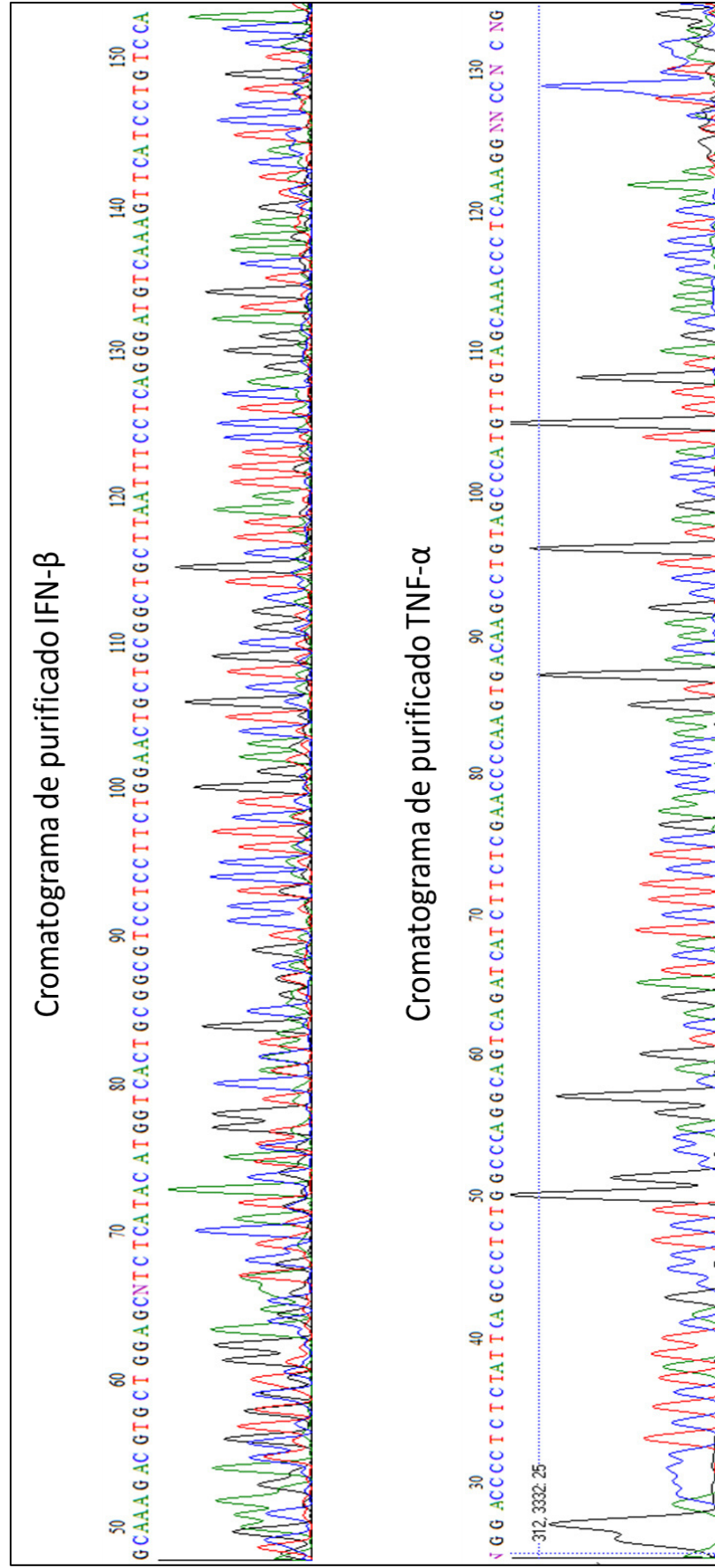


**Figura 10. Electroforesis para purificación de productos de RT-PCR**  
a) Electroforesis en Agarosa *Low Melting* 1.5%. Carril 1-2: producto de IFN- $\beta$ ; Carril 3: Vacío; Carril 4-5: producto de TNF- $\alpha$ . b) Electroforesis de productos purificados en gel de poliacrilamida. M: Marcador de pares de bases (pb); Carril 1: purificado de IFN- $\beta$ ; Carril 2: purificado de TNF- $\alpha$ .

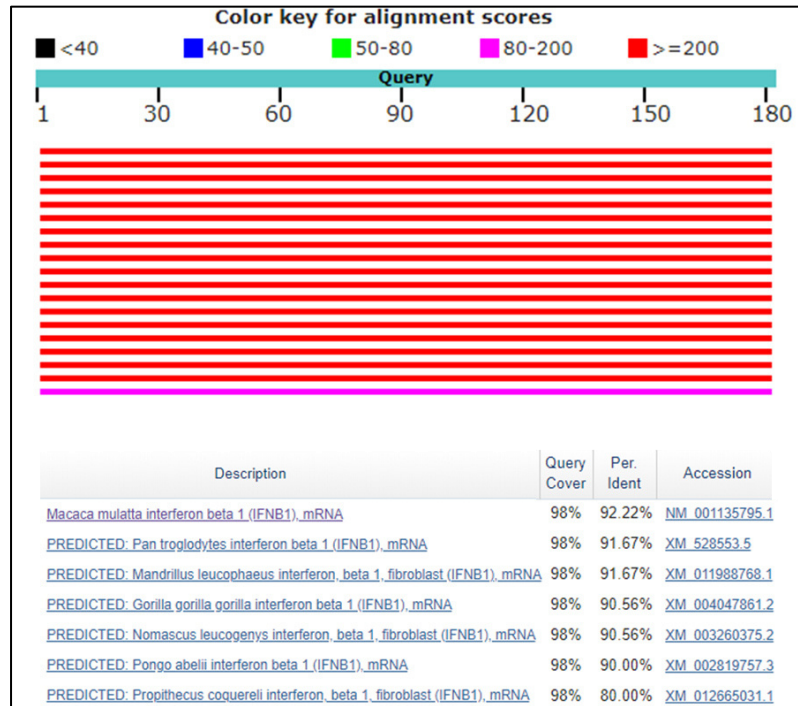
Una vez obtenidos los productos purificados, fueron secuenciados para confirmar que la identidad de los productos obtenidos correspondiera a ambas citocinas.

### 7.3. Análisis de las secuencia de nucleótidos obtenidas.

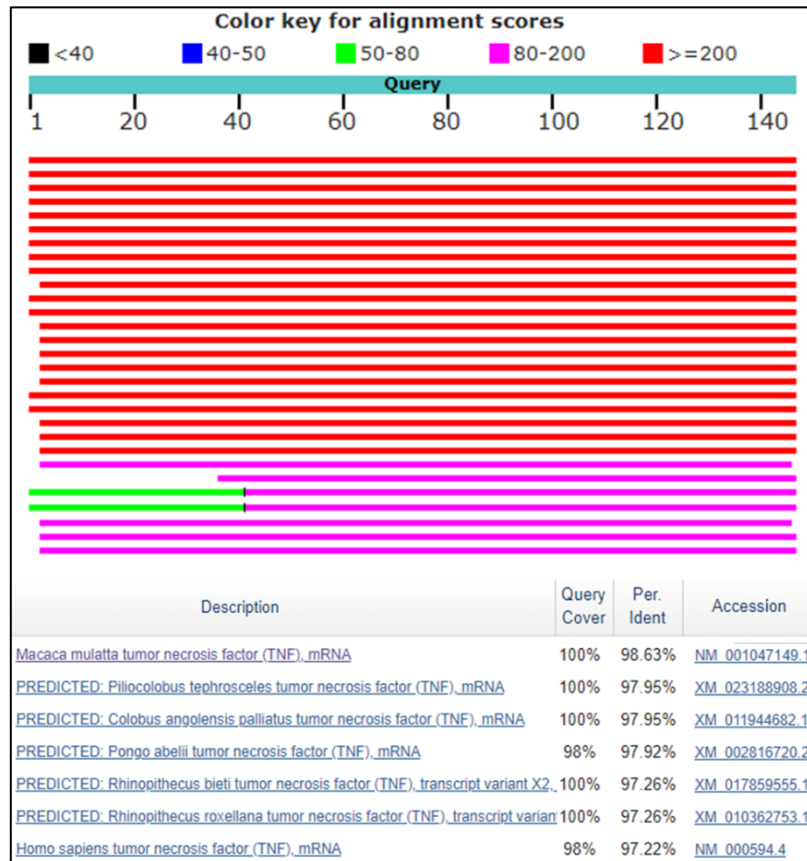
Las secuencias de nucleótidos obtenidas de ambos productos fueron analizadas en el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* v7.2.5 (Figura 11). Posteriormente, se realizó un análisis de identidad mediante el uso de la herramienta bioinformática *BLAST nucleotide* de NCBI (*Highly similar sequences*). Se obtuvo un porcentaje de identidad de 92.22% con el gen de IFN- $\beta$  (Figura 12). Asimismo, se obtuvo un 98.63% con el gen de TNF- $\alpha$  (Figura 13). Ambos genes pertenecientes al organismo de las células MA-104 (*Macaca mulatta*).



**Figura 11.** Cromatogramas de la secuencia de nucleótidos de los productos purificados. El cromatograma superior pertenece al producto de IFN- $\beta$  y el inferior al TNF- $\alpha$ .



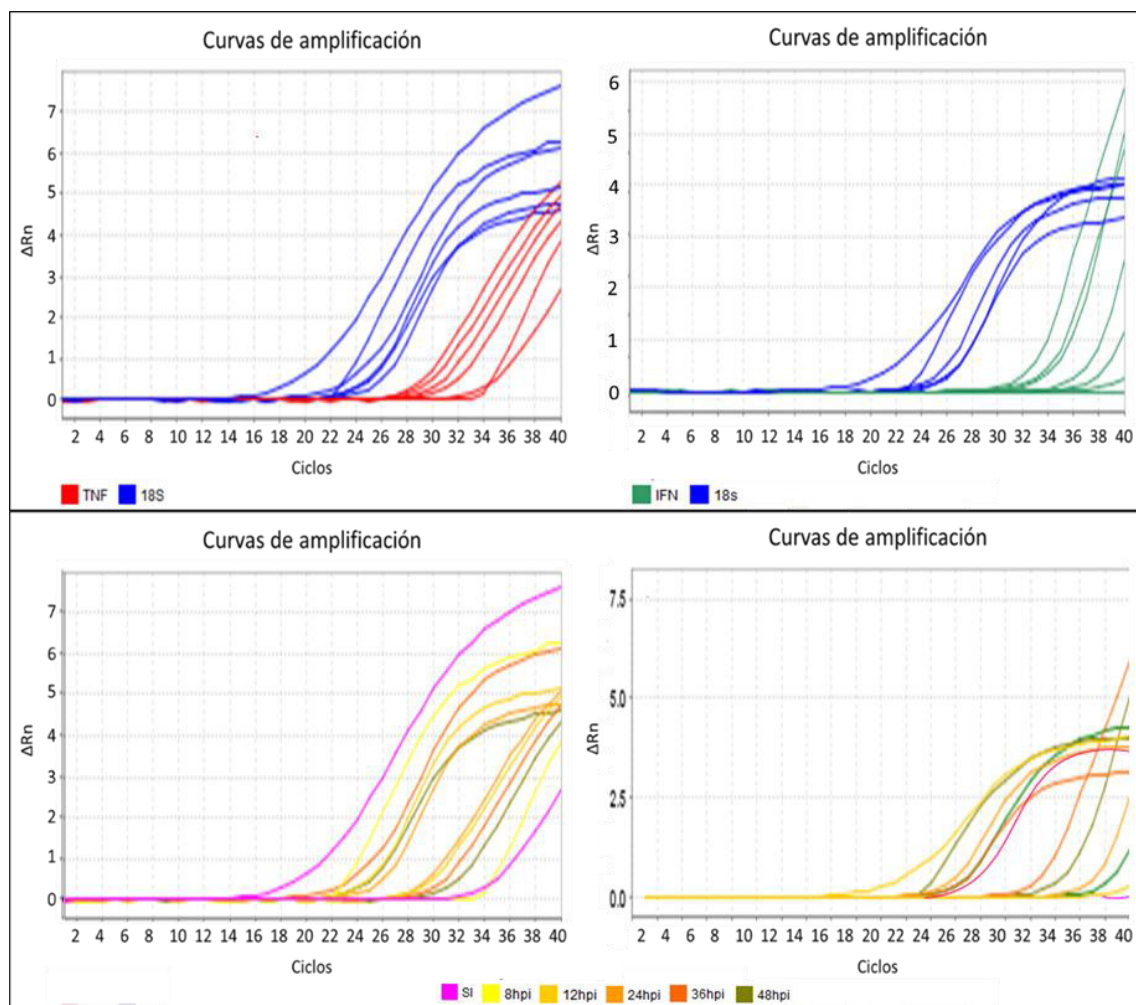
**Figura 12. Análisis de identidad de la secuencia obtenida del IFN- $\beta$  utilizando el programa BLAST nucleotide (NCBI).**



**Figura 13. Análisis de identidad de la secuencia obtenida del TNF- $\alpha$  utilizando el programa BLAST nucleotide (NCBI).**

#### 7.4. Expresión de IFN- $\beta$ y TNF- $\alpha$ en células MA-104 infectadas con rotavirus.

Para una cuantificación de la expresión relativa de IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$ , a partir del ARN extraído de células sin infectar y de los lisados obtenidos en cada tiempo de infección, se realizó una reacción de PCR tiempo real para observar la expresión relativa de estos genes con respecto al gen endógeno 18S. La figura 14 muestra las curvas de amplificación correspondientes al 18S, IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  obtenidas de cada una de las muestras.

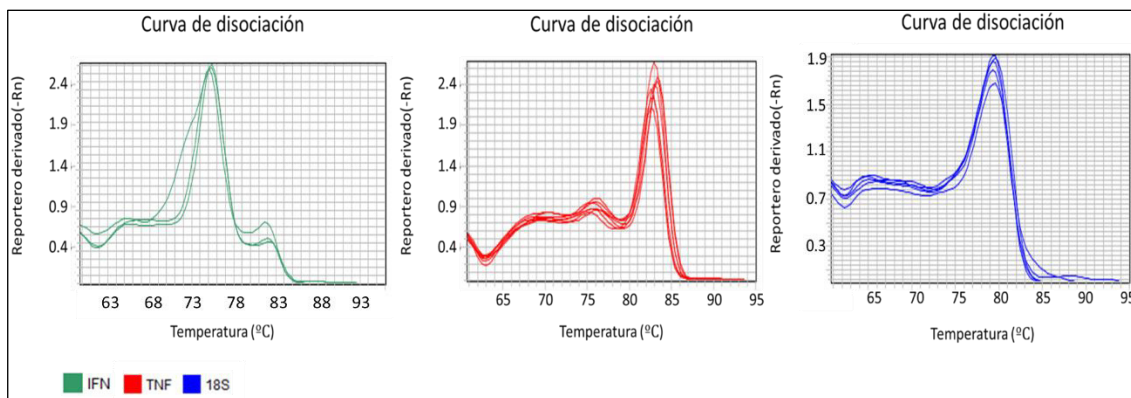


**Figura 14. Curvas de amplificación de productos obtenidos por PCR tiempo real.** En el lado izquierdo se indican las curvas de amplificación obtenidas del control endógeno 18S y el gen blanco TNF- $\alpha$  para cada una de las muestras analizadas. Del lado derecho se indican las curvas de amplificación obtenidas del control endógeno 18S y el gen blanco IFN- $\beta$  para cada una de las muestras analizadas. SI= Células Sin infección.

Al utilizar un sistema de PCR tiempo real basado en la fluorescencia emitida por el agente intercalante *SYBR Green* es necesario incluir una curva de disociación para confirmar que



la amplificación detectada corresponde al producto a amplificar. Las curvas de disociación obtenidas a partir de los amplificadores del 18S, IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  corroboran la amplificación obtenida del producto esperado (Figura 15).



**Figura 15. Curvas de disociación de genes amplificadas por PCR tiempo real.** La curva de disociación correspondiente al gen IFN- $\beta$  está representada con verde, la curva correspondiente al gen TNF- $\alpha$  en rojo y la curva correspondiente al gen 18S en azul.

Los valores del ciclo umbral promedio de cada gen, así como valores de la expresión relativa del IFN- $\beta$  tanto de las células MA-104 sin infectar, como de cada una de las muestras a distintos tiempos de infección con rotavirus se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Valores obtenidos del análisis de PCR tiempo real para la expresión del IFN- $\beta$ .**

Muestra	Gen	CT	$\Delta\Delta C_T$	ExpR
Células sin infectar	18S	20.3832	0.0000	1.0000
Células sin infectar	IFN- $\beta$	36.9284		
8 h.p.i.	18S	22.8791	-0.6674	1.5882
8 h.p.i.	IFN- $\beta$	38.7569		
12 h.p.i.	18S	23.6203	-2.079	4.2278
12 h.p.i.	IFN- $\beta$	38.0856		
24 h.p.i.	18S	24.9476	-12.9449	7,885.2056
24 h.p.i.	IFN- $\beta$	28.5479		
36 h.p.i.	18S	22.0125	-7.8337	228.1327
36 h.p.i.	IFN- $\beta$	30.7239		
48 h.p.i.	18S	24.6037	-6.2418	75.6795
48 h.p.i.	IFN- $\beta$	34.9071		

CT: Ciclo umbral, ExpR: Expresión relativa

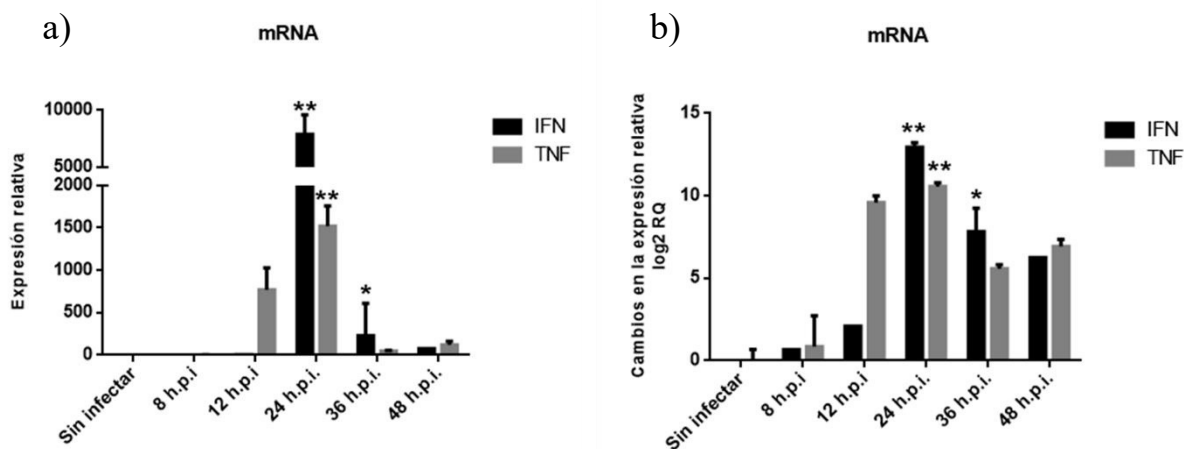
Asimismo, los valores correspondientes a la expresión relativa del TNF- $\alpha$  en los distintos tiempos de infección se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6. Valores obtenidos del análisis de PCR tiempo real para la expresión del TNF- $\alpha$ .**

Muestra	Gen	CT	$\Delta\Delta C_T$	ExpR
Células sin infectar	18S	19.5450	0.0000	1.0000
Células sin infectar	TNF- $\alpha$	34.0850		
8 h.p.i.	18S	20.2793	-0.8588	1.8135
8 h.p.i.	TNF- $\alpha$	33.9605		
12 h.p.i.	18S	24.9107	-9.5864	768.7739
12 h.p.i.	TNF- $\alpha$	29.8642		
24 h.p.i.	18S	25.6960	-10.5691	1,519.2571
24 h.p.i.	TNF- $\alpha$	29.6667		
36 h.p.i.	18S	21.9956	-5.5679	47.4345
36 h.p.i.	TNF- $\alpha$	30.9677		
48 h.p.i.	18S	24.8038	-6.9227	121.3253
48 h.p.i.	TNF- $\alpha$	32.4210		

CT: Ciclo umbral, ExpR: Expresión relativa

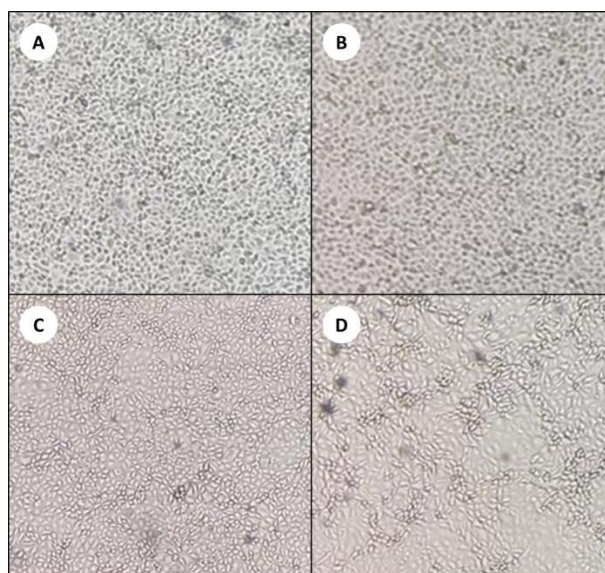
Los cambios observados en la expresión relativa del IFN- $\beta$  indicaron un aumento altamente significativo ( $p=0.0026$ ) a las 24 h.p.i. así como un aumento significativo a las 36 h.p.i. ( $p=0.0276$ ). Por otro lado, los cambios en la expresión relativa del TNF- $\alpha$  indicaron un aumento altamente significativo ( $p=0.0066$ ) a las 24 h.p.i.) (Figura 16).



**Figura 16. Expresión del IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  durante la infección con rotavirus.** a) Niveles de expresión relativa del IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en distintos tiempos de infección con rotavirus con respecto a células MA-104 sin infectar. b) Cambio de la expresión del IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en distintos tiempos de infección con rotavirus con respecto a células MA-104 sin infectar.

### 7.5. Efecto antiviral de lisados de células MA-104 infectadas con rotavirus.

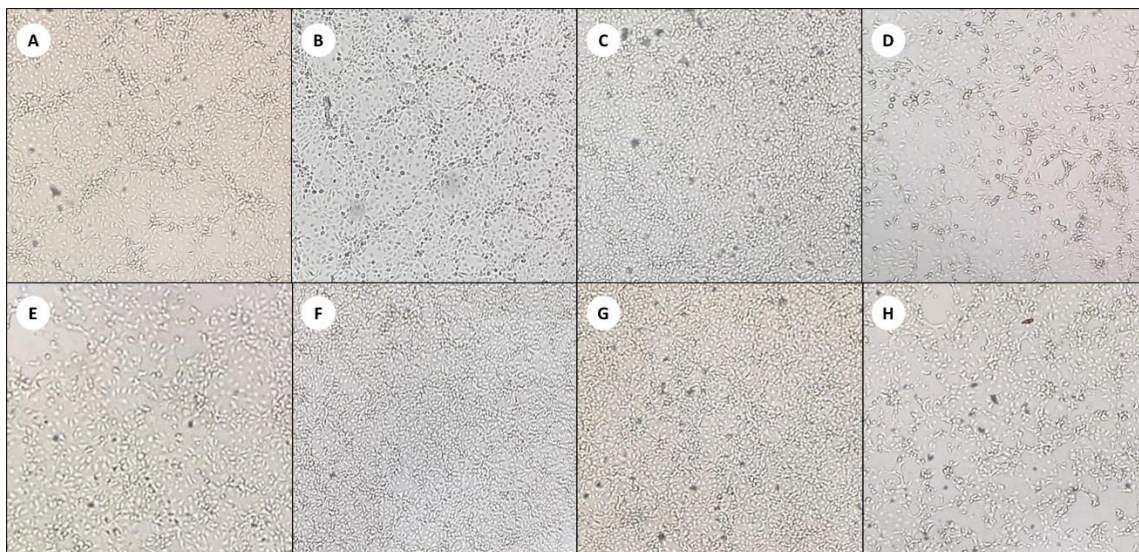
Células MA-104 fueron subcultivadas y posteriormente recibieron una infección primaria con la cepa Wa de rotavirus humano. Se infectaron células con virus inactivado por calor, virus sin tripsina y virus activado con tripsina. Asimismo, células sin infección primaria fueron utilizadas como control. Se evaluó el efecto citopático generado en cada una de las infecciones primarias. El redondeamiento y la lisis celular, así como el desprendimiento de la monocapa fueron nulos en las células sin infección primaria y en las células infectadas con virus inactivado. Asimismo, este efecto fue notorio en células infectadas con el virus, y más intenso en células infectadas con virus activado (Figura 17).



**Figura 17. Efecto citopático a las 8 horas de infección primaria con rotavirus Wa en células MA-104.** A) Células sin infección primaria; B) Células infectadas con virus inactivado; C) Células infectadas con virus; D) Células infectadas con virus activado.

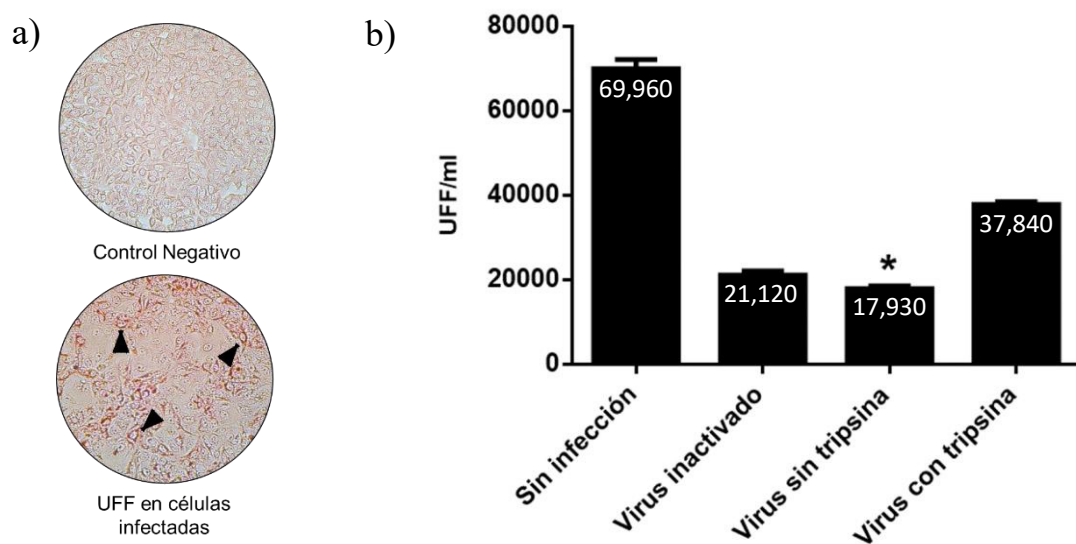
Posterior a las 8 horas de infección primaria, se realizó una segunda infección con virus activado a todas las células. De igual manera el efecto citopático fue evaluado en cada una de las infecciones. A partir de 12 horas de infección secundaria los cambios en efecto citopático fueron evidentes, los cuales se mantuvieron hasta las 24 horas de infección. Se observó un efecto citopático más intenso en las células que no recibieron infección primaria seguido de aquellas que ambas infecciones fueron con virus activado (Figura 18).





**Figura 18. Efecto citopático a distintas horas de infección secundaria con rotavirus Wa en células MA-104 previamente infectadas.** A) Células a las 12 horas de infección secundaria sin infección primaria; B) Células a las 12 horas de infección secundaria infectadas previamente con virus inactivado; C) Células a las 12 horas de infección secundaria infectadas previamente con virus; D) Células a las 12 horas de infección secundaria infectadas previamente con virus activado E) Células a las 24 horas de infección secundaria sin infección primaria; F) Células a las 24 horas de infección secundaria infectadas previamente con virus inactivado; G) Células a las 24 horas de infección secundaria infectadas previamente con virus; H) Células a las 24 horas de infección secundaria infectadas previamente con virus activado.

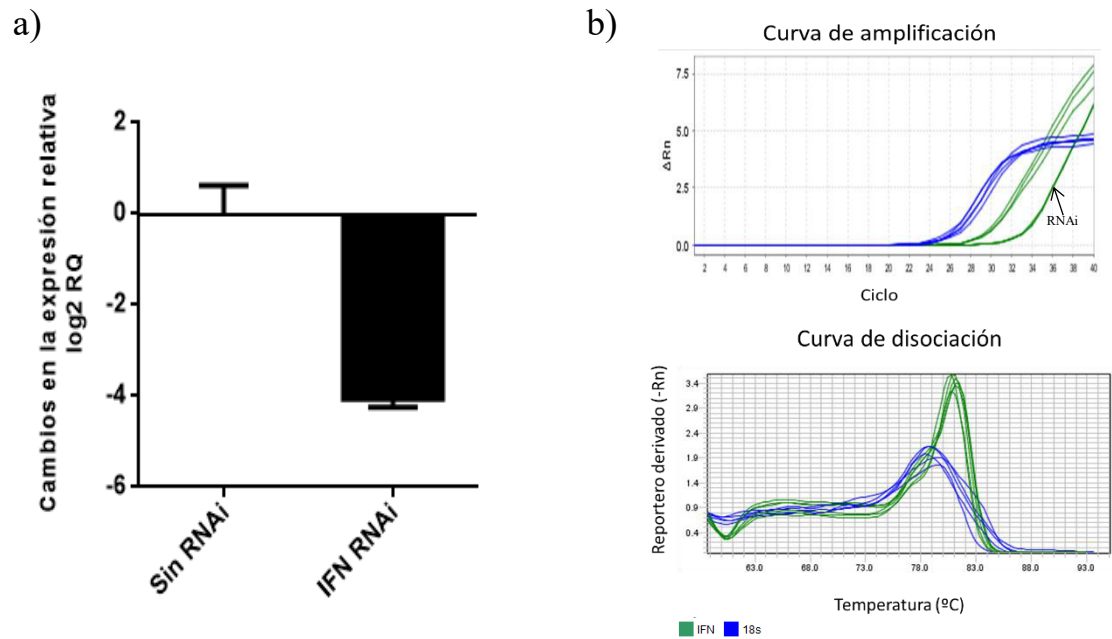
Después de las 24 horas de infección secundaria, el virus fue cosechado mediante ciclos de congelación y descongelación. Los lisados obtenidos fueron titulados mediante el conteo de unidades formadoras de focos (UFF) (figura 19a). Posteriormente se analizaron las UFF/ml existente en cada lisado. La infección primaria con virus sin tripsina mostró una disminución significativa ( $p=0.043$ ) con respecto a las células que no tuvieron infección primaria. Asimismo, la infección primaria tanto con virus inactivado como con virus activado mostraron una reducción en las UFF/ml con respecto a células sin infección primaria (figura 19b).



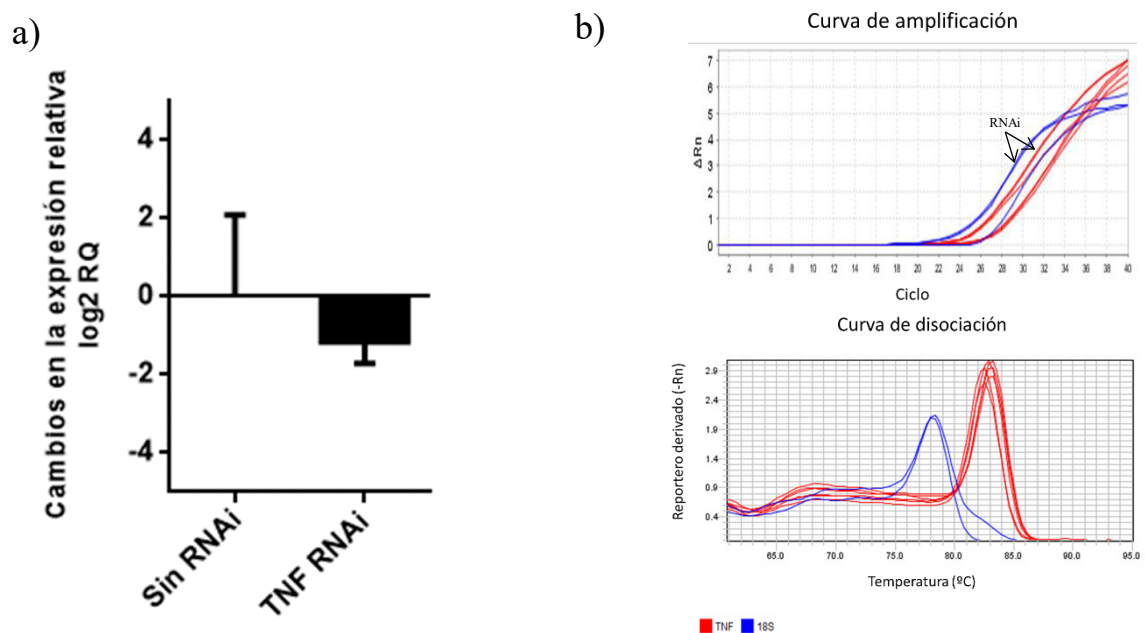
**Figura 19. Microtitulación de rotavirus por Unidades Formadoras de Focos.** a) Comparación entre control negativo y la presencia de unidades formadoras de focos generados por células infectadas. b) Unidades formadoras de focos por mililitro en los distintos tipos de infección primaria con rotavirus.

#### 7.6. Efecto antiviral del IFN- $\beta$ y TNF- $\alpha$ en células MA-104 infectadas con rotavirus.

Para evaluar si el efecto antiviral generado por las propias células infectadas es inducido por la expresión de citocinas, se realizaron ensayos de silenciamiento génico para inhibir la expresión del IFN- $\beta$  y del TNF- $\alpha$ . Mediante ensayos de qPCR se confirmó la reducción en los niveles de expresión del mRNA de IFN- $\beta$  y de TNF- $\alpha$  con respecto a células sin silenciar (figura 20-21).

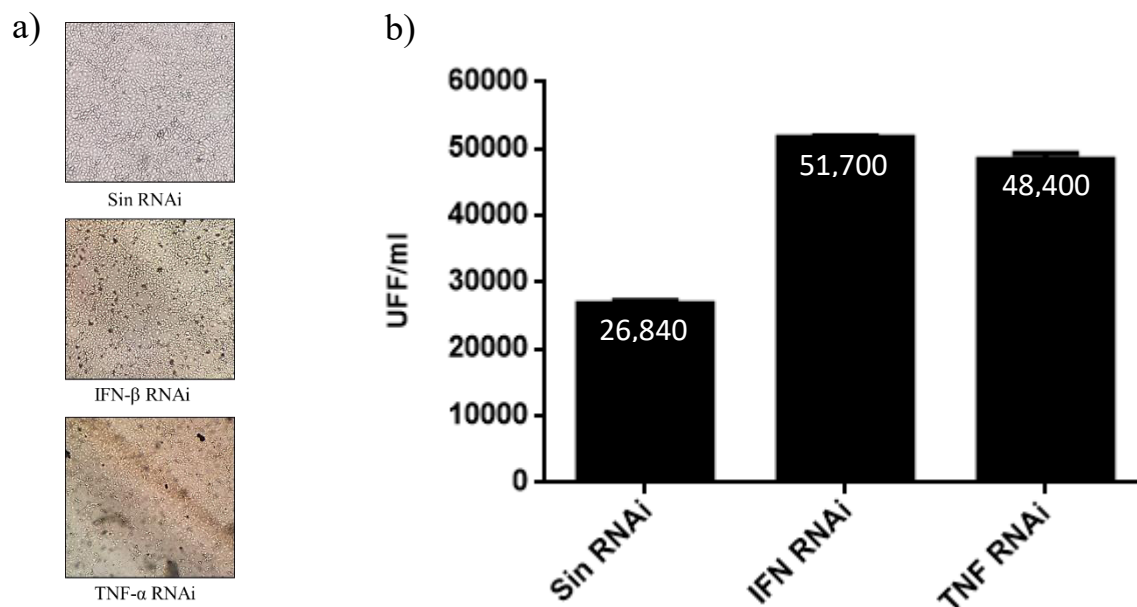


**Figura 20. Expresión de IFN- $\beta$  en células MA-104 infectadas con rotavirus.** a) Cambios en los niveles de expresión del IFN- $\beta$  en células tratadas y no tratadas con el RNA de interferencia. b) Curva de amplificación y de disociación obtenidas a partir de qPCR.



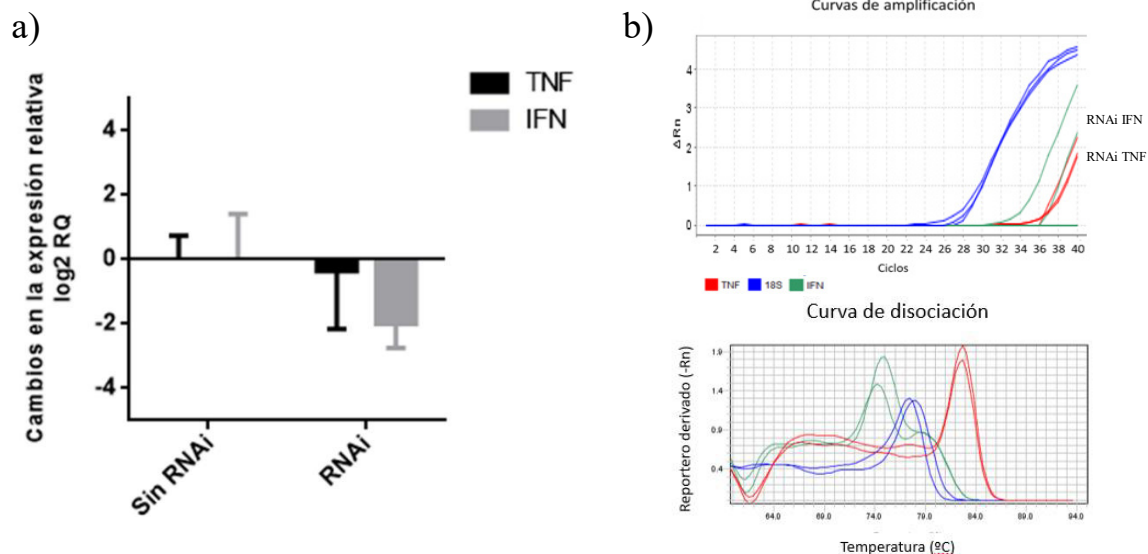
**Figura 21. Expresión de TNF- $\alpha$  en células MA-104 infectadas con rotavirus.** a) Cambios en los niveles de expresión del TNF- $\alpha$  en células tratadas y no tratadas con el RNA de interferencia. b) Curva de amplificación y de disociación obtenidas a partir de qPCR.

Asimismo, se evaluó el establecimiento de la infección de rotavirus en dichas células. El efecto citopático generado por rotavirus en las células silenciadas fue más intenso en comparación con las células que no fueron silenciadas (figura 22a). Asimismo, la cantidad de UFF/ml presentes en el lisado de células silenciadas con cada uno de los RNAs de interferencia tuvo un aumento con respecto a células sin silenciar (figura 22b).



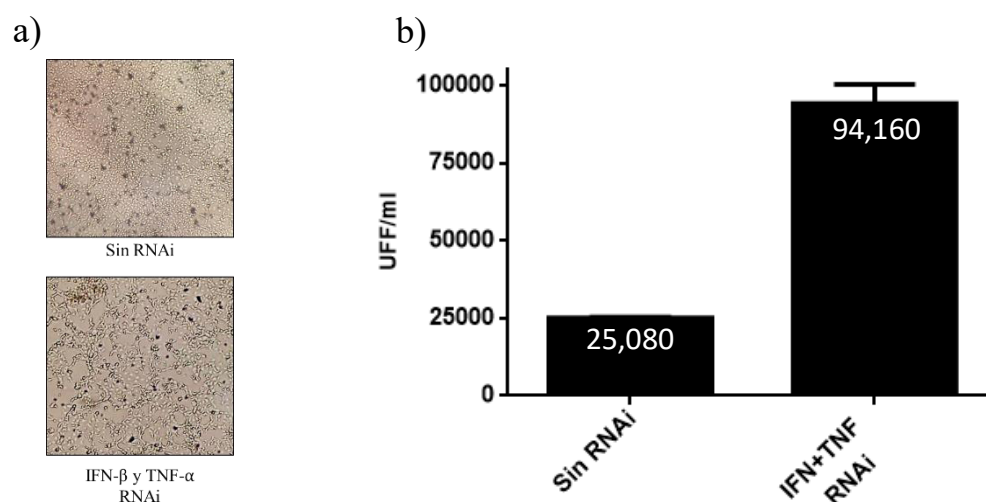
**Figura 22. Efecto del silenciamiento de citocinas en células MA-104 infectadas con rotavirus.** a) Efecto citopático en células MA-104 silenciadas y no silenciadas con el RNA de interferencia dirigido a IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$ . b) Número de UFF/ml en células MA-104 silenciadas y no silenciadas con el RNA de interferencia dirigido a IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

Una vez evaluado el efecto antiviral que ejerce cada una de las citocinas contra rotavirus, se realizó un silenciamiento simultáneo utilizando ambos RNAs de interferencia en subcultivo de células MA-104. La disminución del mRNA del IFN- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  fue determinada mediante RT-qPCR (figura 23).



**Figura 23. Expresión de IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en células MA-104 infectadas con rotavirus.** a) Cambios en los niveles de expresión del IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en células tratadas y no tratadas con los RNA de interferencia. b) Curva de amplificación y de disociación obtenidas a partir de qPCR.

Una vez obtenida la disminución en la expresión de ambas citocinas se realizó una microtitulación viral para determinar el número de UFF/ml en las células tratadas con ambos RNAs de interferencia. El efecto citopático fue más intenso en las células que fueron silenciadas (Figura 24a). La cantidad de UFF/ml en las células silenciadas aumentaron casi 4 veces con respecto al control sin silenciar (Figura 24b).



**Figura 24. Efecto del silenciamiento simultáneo de citocinas en células MA-104 infectadas con rotavirus.** a) Efecto citopático en células MA-104 silenciadas y no silenciadas con el RNA de interferencia dirigido a IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$ . b) Número de UFF/ml en células MA-104 silenciadas y no silenciadas con el RNA de interferencia dirigido a IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

## 8. DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó el efecto antiviral generado por citocinas expresadas en células MA-104 infectadas con rotavirus. La cepa de rotavirus humano Wa con genotipo G1P[8] fue utilizada como cepa de referencia. Asimismo, células MA-104 fueron utilizadas debido a que son un modelo estandarizado para la infectividad con cepas de rotavirus (Ward *et al.*, 1984).

El establecimiento de la infección se evaluó mediante la presencia del virus detectada por el efecto citopático observado y por la visualización de los 11 segmentos de doble cadena de ARN característicos de rotavirus durante los distintos tiempos la infección. El efecto citopático observado desde las primeras horas de infección concuerda con lo descrito en otros estudios relacionados, incluyendo el redondeamiento de células, desprendimiento de la monocapa y lisis celular (Castrucci *et al.*, 1983; Merwad *et al.*, 2014). Dicho efecto citopático se relaciona con la presencia de los 11 segmentos característicos de rotavirus, ya que se observan desde las primeras 12 h.p.i. Además, los electroferotipos obtenidos concuerdan con el patrón de bandas característico de los rotavirus pertenecientes al grupo A (4,2,3,2) (Saif y Thiel, 1989). Asimismo, la presencia de proteínas detectada por el SDS-PAGE, muestra un decremento de proteínas celulares desde inicios de la infección con rotavirus, lo cual se puede atribuir al arresto de la maquinaria de traducción celular por parte de rotavirus. Se ha relacionado a una de las proteínas no estructurales NSP3 con este tipo de arresto celular (Piron *et al.*, 1998). Sin embargo, a las 8 h.p.i. aún son visibles bandas proteicas, lo que podría deberse a que algunas de las proteínas presentes son propiamente del virus. La presencia de VP8\* detectada por el inmunoensayo de dot-blot, ayuda a relacionar esta información, ya que demuestra la presencia de la proteína desde las 8 h.p.i. Este resultado concuerda con un estudio que demuestra una disminución en la producción de proteínas celulares y un aumento de proteínas de rotavirus en las primeras horas de infección (Piron *et al.*, 1998). En conjunto, estos resultados nos hablan del correcto establecimiento de la infección con rotavirus en la línea celular MA-104.

Una vez que se da la penetración de rotavirus a la célula, inicia el reconocimiento por parte de los PRR y se da la activación de las distintas vías de señalización, desencadenando la expresión de diversas citocinas. El IFN es reconocido por su expresión en infecciones



virales. Estudios *in vitro* han demostrado la expresión de IFN- $\beta$  ante infecciones con rotavirus (Broquet *et al.*, 2011) y otras infecciones virales (Miller y Anders, 2003; Stanifer *et al.*, 2017). Dichos resultados se relacionan con la expresión de IFN- $\beta$  determinada en este estudio. Por otro lado, la expresión de TNF- $\alpha$  inducida por la infección coincide con la expresión de esta citocina en distintas líneas celulares bajo diversas infecciones virales (Munis *et al.*, 1990; Nain *et al.*, 1990; Paludan *et al.*, 2001). Asimismo, la expresión de TNF- $\alpha$  en macrófagos se ha relacionado con la presencia de la proteína NSP4 de rotavirus (Ge *et al.*, 2013). Rotavirus ejerce mecanismos de evasión a la respuesta inmune de diversas maneras, una de ellas es mediada por la proteína NSP1 que induce la inhibición de expresión del IFN (Arnold y Patton, 2011). Por lo tanto, se cree que la disminución de la expresión de ambas citocinas se deba a estos mismos mecanismos de evasión, ya que la proteína NSP1 inhibe proteínas celulares activadoras de las casadas de señalización que inducen la expresión de IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Graff *et al.*, 2009).

Al realizar el ensayo de interferencia viral, las células que recibieron una infección primaria con rotavirus sin tripsina presentaron un efecto citopático menos agresivo con respecto a las células infectadas con tripsina. Estudios validan el uso de tripsina como activador del virus, ya que aumenta la infectividad a través de la escisión de la proteína VP4. Dicha escisión facilita la adhesión y subsecuente penetración del virus a la célula (Almeida *et al.*, 1978; S. Clark *et al.*, 1981; Padilla-Noriega *et al.*, 1995). Por otro lado, células infectadas con virus inactivado por calor mostraron un comportamiento similar a las células que no recibieron infección. Esto es debido a que los tratamientos de calor en rotavirus son eficientes para su inactivación, generando una disminución significativa de la infectividad del virus (Mary Kolb Estes *et al.*, 1979). La infección secundaria con rotavirus activado generó un efecto citopático más intenso y un título viral más elevado en células sin infección primaria con respecto a aquellas que recibieron infección primaria aun con virus inactivado. Esto sugiere que los lisados previos pueden contener agentes inductores de interferencia viral. Dicho fenómeno fue descubierto con las numerosas investigaciones realizadas por Isaacs, Lindenmann y colaboradores, lo que dio lugar al descubrimiento del interferón y su efecto antiviral contra influenza (Isaacs y Lindenmann, 1957, 1972; Isaacs *et al.*, 1957; Lindenmann *et al.*, 1957). Sin embargo, es posible que

además del IFN, pudieran estar presentes otros agentes que intervengan en el proceso de interferencia viral.

El silenciamiento del IFN- $\beta$  y del TNF- $\alpha$  mediante el uso de ARN de interferencia generó un efecto citopático más intenso en las células silenciadas. Asimismo, las UFF/ml en células tratadas con el ARN de interferencia e infectadas con rotavirus fue más elevado que el control. Esto sugiere que ambas citocinas expresadas por las células infectadas con rotavirus tienen importancia en el proceso de interferencia viral. El aumento de UFF de rotavirus generado por el silenciamiento del IFN- $\beta$  indica un efecto antiviral inducido por esta citocina. Este efecto antiviral concuerda con artículos donde el IFN de tipo I tiene una actividad contra rotavirus en células epiteliales (Frias *et al.*, 2012; Mohamad S Hakim *et al.*, 2018). Por otro lado, el efecto antiviral generado por parte del TNF- $\alpha$  se relaciona con un estudio que demuestra la actividad anti-rotavirus de TNF- $\alpha$  recombinante como tratamiento *in vitro* suministrado antes de la infección (M. S. Hakim *et al.*, 2018). Asimismo, el efecto antiviral de TNF- $\alpha$  ha sido descrito contra otros agentes virales (Mestan *et al.*, 1986; Seo y Webster, 2002; Wong *et al.*, 1988).

Además del silenciamiento de cada citocina, se realizó un ensayo de silenciamiento simultáneo para disminuir la expresión de ambas citocinas en un mismo cultivo de células MA-104. Estudios validan el silenciamiento génico de distintos genes a la vez mediante el uso de diferentes ARNs de interferencia (Doan *et al.*, 2014; Werner *et al.*, 2016). El silenciamiento de ambas citocinas generó un aumento de casi 4 veces el número de UFF/ml de rotavirus con respecto al control. Dado que el silenciamiento de cada una de las citocinas aumentaba al doble la cantidad de UFF/ml de rotavirus, se pudiera decir que el silenciamiento simultáneo da indicios de que el IFN- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  actúan de manera sinérgica para disminuir la cantidad de virus. El efecto antiviral sinérgico de estas citocinas se relaciona con un estudio que demuestra un mayor efecto antiviral contra el virus de hepatitis B usando tratamientos combinados de IFN- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en un sistema *in vitro* (Isorce *et al.*, 2016).

En conjunto, todos los resultados demuestran que el establecimiento de la infección con rotavirus en células MA-104 induce la expresión de IFN- $\beta$  y TNF- $\alpha$  ejerciendo un efecto antiviral mediante una disminución en las unidades formadoras de focos de rotavirus.



## 9. CONCLUSIONES

- El establecimiento de la infección con rotavirus en células MA-104 induce la expresión de IFN- $\beta$  y de TNF- $\alpha$ .
- El establecimiento de la infección con rotavirus en células MA-104 induce un aumento significativo en la expresión de IFN- $\beta$  y de TNF- $\alpha$  a las 24 horas de infección.
- El establecimiento de la infección con rotavirus en células MA-104 induce cambios en la expresión de IFN- $\beta$  y de TNF- $\alpha$  durante 48 horas de infección.
- Lisados de células MA-104 infectadas con rotavirus inducen un estado antiviral preventivo.
- El IFN- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  expresados por células MA-104 infectadas con rotavirus generan un efecto antiviral.
- El IFN- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  expresados por células MA-104 infectadas con rotavirus actúan de manera sinérgica para genera un mayor efecto antiviral.

## **10. PERSPECTIVAS**

- Analizar un perfil extenso de citocinas expresadas por la infección con rotavirus.
- Determinar el efecto antiviral de otras citocinas implicadas en la infección con rotavirus.
- Evaluar posibles mecanismos de evasión en la expresión de citocinas generada por la infección con rotavirus.
- Dilucidar los posibles mecanismos antivirales generados por la acción de las citocinas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Alcami, A. y Koszinowski, U. H. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Trends in microbiology*, 8(9), 410-418.
- Almeida, J. D., Hall, T., Banatvala, J., Totterdell, B. y Chrystie, I. (1978). The effect of trypsin on the growth of rotavirus. *Journal of general virology*, 40(1), 213-218.
- Angel, J., Steele, A. D. y Franco, M. A. (2014). Correlates of protection for rotavirus vaccines: Possible alternative trial endpoints, opportunities, and challenges. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(12), 3659-3671.
- Aoki, S. T., Settembre, E. C., Trask, S. D., Greenberg, H. B., Harrison, S. C. y Dormitzer, P. R. (2009). Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science*, 324(5933), 1444-1447.
- Arnold, M. M., Barro, M. y Patton, J. T. (2013). Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain. *Journal of virology*, 87(17), 9813-9821.
- Arnold, M. M. y Patton, J. T. (2011). Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *Journal of virology*, 85(5), 1970-1979.
- Ball, J. M., Tian, P., Zeng, C. Q.-Y., Morris, A. P. y Estes, M. K. (1996). Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, 272(5258), 101-104.
- Barro, M. y Patton, J. T. (2007). Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *Journal of virology*, 81(9), 4473-4481.
- Bell, J. K., Mullen, G. E., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R. y Segal, D. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in immunology*, 24(10), 528-533.
- Bishop, R., Davidson, G., Holmes, I. y Ruck, B. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *The Lancet*, 302(7841), 1281-1283.

- Blackwell, T. S. y Christman, J. W. (1997). The role of nuclear factor- $\kappa$  B in cytokine gene regulation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 17(1), 3-9.
- Botos, I., Segal, D. M. y Davies, D. R. (2011). The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*, 19(4), 447-459.
- Broquet, A. H., Hirata, Y., McAllister, C. S. y Kagnoff, M. F. (2011). RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *The Journal of Immunology*, 186(3), 1618-1626.
- Carreño-Torres, J. J., Gutiérrez, M., Arias, C. F., López, S. y Isa, P. (2010). Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection. *Virology journal*, 7(1), 350.
- Castrucci, G., Ferrari, M., Frigeri, F., Cilli, V., Donelli, G., Angelillo, G. y Bruggi, M. (1983). A study of cytopathic rotavirus strains isolated from calves with acute enteritis. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 6(3), 253-264.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Rotavirus. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/rotavirus/about/index.html>
- Clark, A., Black, R., Tate, J., Roose, A., Kotloff, K., Lam, D., . . . Kang, G. (2017). Estimating global, regional and national rotavirus deaths in children aged < 5 years: current approaches, new analyses and proposed improvements. *PloS one*, 12(9).
- Clark, K., Takeuchi, O., Akira, S. y Cohen, P. (2011). The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the I $\kappa$ B kinase family during Toll-like receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), 17093-17098.
- Clark, S., Roth, J., Clark, M., Barnett, B. y Spendlove, R. (1981). Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *Journal of virology*, 39(3), 816-822.
- Clausen, J., Vergeiner, B., Enk, M., Petzer, A. L., Gastl, G. y Gunsilius, E. (2003). Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology*, 207(2), 85-93.

- Contin, R., Arnoldi, F., Mano, M. y Burrone, O. (2011). Rotavirus replication requires a functional proteasome for effective assembly of viroplasms. *Journal of virology*.
- Cotton, J. A., Platnich, J. M., Muruve, D.A., Jijon, H. B., Buret, A.G., y Beck, P. L. (2016). Interleukin-8 in gastrointestinal inflammation and malignancy: induction and clinical consequences. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*(8), 13-34.
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., . . . Kang, G. (2017). Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17083.
- Cheung, W., Gill, M., Esposito, A., Kaminski, C. F., Courousse, N., Chwetzoff, S., . . . Desselberger, U. (2010). Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *Journal of virology*, 84(13), 6782-6798.
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R. y Roitt, I. M. (2017). *Essential immunology*: John Wiley & Sons.
- Di Paolo, N. C. y Shayakhmetov, D. M. (2016). Interleukin 1 $\alpha$  and the inflammatory process. *Nature Immunology*, 17(8), 906.
- Doan, C. C., Le, L. T., Hoang, S. N., Do, S. M. y Van Le, D. (2014). Simultaneous silencing of VEGF and KSP by siRNA cocktail inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *Biological research*, 47(1), 70.
- Dormitzer, P. R., Nason, E. B., Prasad, B. V. y Harrison, S. C. (2004). Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature*, 430(7003), 1053.
- Dunn, S. J., Cross, T. L. y Greenberg, H. B. (1994). Comparison of the rotavirus nonstructural protein NSP1 (NS53) from different species by sequence analysis and northern blot hybridization. *Virology*, 203(1), 178-183.
- e Sousa, C. R. (2004). Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Current opinion in immunology*, 16(1), 21-25.
- Esona, M. D. y Gautam, R. (2015). Rotavirus. *Clin Lab Med*, 35(2), 363-391. doi: 10.1016/j.cll.2015.02.012

- Estes, M. K., Graham, D. Y., Smith, E. M. y Gerba, C. P. (1979). Rotavirus stability and inactivation. *Journal of general virology*, 43(2), 403-409.
- Estes, M. K. y Greenberg, H. B. (2013). Rotaviruses. En D. M. Knipe, Howley, P. M., et al (Ed.), *Fields virology* (pp. 1348-1401). Philadelphia: Kluwer/Lippincott.
- Estes, M. K. y Morris, A. P. (1999). A viral enterotoxin *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases 2* (pp. 73-82): Springer.
- Flewett, T., Bryden, A., Davies, H., Woode, G., Bridger, J. y Derrick, J. (1974). Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *The Lancet*, 304(7872), 61-63.
- Freeman, B. E., Raué, H.-P., Hill, A. B. y Slifka, M. K. (2015). Cytokine-mediated activation of NK cells during viral infection. *Journal of virology*, JVI. 00199-00115.
- Frias, A. H., Jones, R. M., Fifadara, N. H., Vijay-Kumar, M. y Gewirtz, A. T. (2012). Rotavirus-induced IFN- $\beta$  promotes anti-viral signaling and apoptosis that modulate viral replication in intestinal epithelial cells. *Innate immunity*, 18(2), 294-306.
- Friederichs, K., Schmitz, J., Weissenbach, M., Heinrich, P. C. y Schaper, F. (2001). Interleukin-6-induced proliferation of pre-B cells mediated by receptor complexes lacking the SHP2/SOCS3 recruitment sites revisited. *European journal of biochemistry*, 268(24), 6401-6407.
- Gandhi, G. R., Santos, V. S., Denadai, M., da Silva Calisto, V. K., Quintans, J. d. S. S., e Silva, A. M. d. O., . . . Júnior, L. J. Q. (2017). Cytokines in the management of rotavirus infection: A systematic review of in vivo studies. *Cytokine*, 96, 152-160.
- Ge, Y., Mansell, A., Ussher, J. E., Brooks, A. E., Manning, K., Wang, C. J. y Taylor, J. A. (2013). Rotavirus NSP4 triggers secretion of proinflammatory cytokines from macrophages via Toll-like receptor 2. *Journal of virology*, 87(20), 11160-11167.
- Graff, J. W., Ettayebi, K. y Hardy, M. E. (2009). Rotavirus NSP1 inhibits NF $\kappa$ B activation by inducing proteasome-dependent degradation of  $\beta$ -TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS pathogens*, 5(1), e1000280.

- Graff, J. W., Mitzel, D. N., Weisend, C. M., Flenniken, M. L. y Hardy, M. E. (2002). Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *Journal of virology*, 76(18), 9545-9550.
- Greenberg, H. B. y Estes, M. K. (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 136(6), 1939-1951.
- Hakim, M. S., Chen, S., Ding, S., Yin, Y., Ikram, A., Ma, X.-x., . . . Pan, Q. (2018). Basal interferon signaling and therapeutic use of interferons in controlling rotavirus infection in human intestinal cells and organoids. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Hakim, M. S., Ding, S., Chen, S., Yin, Y., Su, J., van der Woude, C. J., . . . Wang, W. (2018). TNF-alpha exerts potent anti-rotavirus effects via the activation of classical NF-kappaB pathway. *Virus Res*, 253, 28-37. doi: 10.1016/j.virusres.2018.05.022
- Hemmi, H. y Akira, S. (2005). TLR signalling and the function of dendritic cells *Mechanisms of Epithelial Defense* (Vol. 86, pp. 120-135): Karger Publishers.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., . . . Akira, S. (2004). The roles of two I $\kappa$ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *Journal of Experimental Medicine*, 199(12), 1641-1650.
- Hilbert, D., Cancro, M., Scherle, P., Nordan, R., Van Snick, J., Gerhard, W. y Rudikoff, S. (1989). T cell derived IL-6 is differentially required for antigen-specific antibody secretion by primary and secondary B cells. *The Journal of Immunology*, 143(12), 4019-4024.
- Ho, D., Rota, T., Kaplan, J., Hartshorn, K., Andrews, C., Schooley, R. y Hirsch, M. (1985). Recombinant human interferon alfa-A suppresses HTLV-III replication in vitro. *The Lancet*, 325(8429), 602-604.
- Holloway, G. y Coulson, B. S. (2013). Innate cellular responses to rotavirus infection. *Journal of General Virology*, 94(6), 1151-1160.
- Hu, L., Crawford, S. E., Czako, R., Cortes-Penfield, N. W., Smith, D. F., Le Pendu, J., . . . Prasad, B. V. (2012). Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*, 485(7397), 256.

- Hu, L., Crawford, S. E. y Estes, M. K. (2010). Rotavirus structure and functional implications. En N. T. Hein, Baldacci, G., Haenni, A. L. y Benedetti, E. L. (Ed.), *Viruses Responsible for Emerging Disease in South-East Asia*. Universite Paris Diderot.
- Isaacs, A. y Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 147(927), 258-267.
- Isaacs, A. y Lindenmann, J. (1972). Production of viral interfering substances: Google Patents.
- Isaacs, A., Lindenmann, J. y Valentine, R. C. (1957). Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 147(927), 268-273.
- Isorce, N., Testoni, B., Locatelli, M., Fresquet, J., Rivoire, M., Luangsay, S., . . . Durantel, D. (2016). Antiviral activity of various interferons and pro-inflammatory cytokines in non-transformed cultured hepatocytes infected with hepatitis B virus. *Antiviral research*, 130, 36-45.
- Ito, H., Esashi, E., Akiyama, T., Inoue, J.-i. y Miyajima, A. (2006). IL-18 produced by thymic epithelial cells induces development of dendritic cells with CD11b in the fetal thymus. *International immunology*, 18(8), 1253-1263.
- Jiang, B., Gentsch, J. R. y Glass, R. I. (2002). The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clinical Infectious Diseases*, 34(10), 1351-1361.
- Jiang, B., Snipes-Magaldi, L., Dennehy, P., Keyserling, H., Holman, R., Bresee, J., . . . Glass, R. (2003). Cytokines as mediators for or effectors against rotavirus disease in children. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10(6), 995-1001.
- Kanneganti, T.-D., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.-H., Whitfield, J., Franchi, L., . . . Inohara, N. (2006). Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 281(48), 36560-36568.
- Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology*, 3(12), 984.



- Karampatsas, K., Osborne, L., Seah, M.-L., Tong, C. Y. y Prendergast, A. J. (2018). Clinical characteristics and complications of rotavirus gastroenteritis in children in east London: A retrospective case-control study. *PloS one*, 13(3), e0194009.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., . . . Ishii, K. J. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089), 101.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., . . . Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I-and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature immunology*, 6(10), 981.
- Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., . . . Donnelly, R. P. (2003). IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature immunology*, 4(1), 69.
- Kovacs-Nolan, J., Dongwan, Y. y Yoshinori, M. (2003). Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus. *Biochemical Journal*, 376(1), 269-275.
- Lambotin, M., Raghuraman, S., Stoll-Keller, F., Baumert, T. F. y Barth, H. (2010). A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 350.
- Lee, K. Y., Moon, C. H. y Choi, S. H. (2018). Type I interferon and proinflammatory cytokine levels in cerebrospinal fluid of newborns with rotavirus-associated leukoencephalopathy. *Brain and Development*, 40(3), 211-217.
- Lester, S. N. y Li, K. (2014). Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J Mol Biol*, 426(6), 1246-1264. doi: 10.1016/j.jmb.2013.11.024
- Lindenmann, J., Burke, D. y Isaacs, A. (1957). Studies on the production, mode of action and properties of interferon. *British journal of experimental pathology*, 38(5), 551.
- Liu, K., Yang, X., Wu, Y. y Li, J. (2009). Rotavirus strategies to evade host antiviral innate immunity. *Immunology letters*, 127(1), 13-18.
- López, S. y Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends in microbiology*, 12(6), 271-278.
- López, S., Sánchez-Tacuba, L., Moreno, J. y Arias, C. F. (2016). Rotavirus strategies against the innate antiviral system. *Annual review of virology*, 3, 591-609.

- Lundgren, O., Peregrin, A. T., Persson, K., Kordasti, S., Uhnoo, I. y Svensson, L. (2000). Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*, 287(5452), 491-495.
- Mack, E. A., Kallal, L. E., Demers, D. A. y Biron, C. A. (2011). Type 1 interferon induction of natural killer cell gamma interferon production for defense during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *MBio*, 2(4), e00169-00111.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D. M., Vucic, D., French, D. M., Lee, W. P., . . . Dixit, V. M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, 430(6996), 213.
- Matthijnssens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M. y Johne, R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of virology*, 157(6), 1177-1182.
- McClain, B., Settembre, E., Temple, B. R., Bellamy, A. R. y Harrison, S. C. (2010). X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 397(2), 587-599.
- Merwad, A., Abdallah, F. y Saber, T. (2014). Close relationship of group A rotaviruses between bovine and human based on VP7 gene sequence in Egypt. *Pak Vet J*, 34(3), 391-393.
- Mestan, J., Digel, W., Mitnacht, S., Hillen, H., Blohm, D., Möller, A., . . . Kirchner, H. (1986). Antiviral effects of recombinant tumour necrosis factor in vitro. *Nature*, 323(6091), 816.
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M. y Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-κB activation. *Nature Immunology*, 5(5), 503.
- Miller, J. L. y Anders, E. M. (2003). Virus-cell interactions in the induction of type 1 interferon by influenza virus in mouse spleen cells. *Journal of general virology*, 84(1), 193-202.
- Mogensen, T. H. y Paludan, S. R. (2001). Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 131-150.
- Moon, W. H. (1994). Pathophysiology of viral diarrhea. *Viral infections of the gastrointestinal tract*, 27-52.

- Morelli, M., Dennis, A. F. y Patton, J. T. (2015). Putative E3 ubiquitin ligase of human rotavirus inhibits NF- $\kappa$ B activation by using molecular mimicry to target  $\beta$ -TrCP. *MBio*, 6(1), e02490-02414.
- Mosser, D. M. y Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958.
- Munis, J. R., Richman, D. D. y Kornbluth, R. (1990). Human immunodeficiency virus-1 infection of macrophages in vitro neither induces tumor necrosis factor (TNF)/cachectin gene expression nor alters TNF/cachectin induction by lipopolysaccharide. *The Journal of clinical investigation*, 85(2), 591-596.
- Nain, M., Hinder, F., Gong, J.-H., Schmidt, A., Bender, A., Sprenger, H. y Gemsa, D. (1990). Tumor necrosis factor-alpha production of influenza A virus-infected macrophages and potentiating effect of lipopolysaccharides. *The Journal of Immunology*, 145(6), 1921-1928.
- O'Ryan, M. L. (2011). Virus y diarreas. En L. F. Avedaño, Ferrés, M. y Spencer, E. (Ed.), *Virología Clínica* (pp. 139-141). Santiago, Chile: Mediterraneo Ltda.
- Owen, J. A., Punto, J. y Jones, P. P. (2013). *Kuby Immunology* (7th ed.): McGraw Hill Education.
- Padilla-Noriega, L., Dunn, S. J., López, S., Greenberg, H. B. y Arias, C. F. (1995). Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5\* and VP8\* of human rotavirus ST3. *Virology*, 206(1), 148-154.
- Paludan, S. R., Ellermann-Eriksen, S., Kruys, V. y Mogensen, S. C. (2001). Expression of TNF-alpha by herpes simplex virus-infected macrophages is regulated by a dual mechanism: transcriptional regulation by NF-kappa B and activating transcription factor 2/Jun and translational regulation through the AU-rich region of the 3' untranslated region. *J Immunol*, 167(4), 2202-2208. doi: 10.4049/jimmunol.167.4.2202
- Pantel, A., Teixeira, A., Haddad, E., Wood, E. G., Steinman, R. M. y Longhi, M. P. (2014). Direct type I IFN but not MDA5/TLR3 activation of dendritic cells is required for maturation and metabolic shift to glycolysis after poly IC stimulation. *PLoS biology*, 12(1), e1001759.

- Piron, M., Vende, P., Cohen, J. y Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly (A) binding protein from eIF4F. *The EMBO journal*, 17(19), 5811-5821.
- Ramig, R. F. (2007). Systemic rotavirus infection. *Expert review of anti-infective therapy*, 5(4), 591-612.
- Randall, R. E. y Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of general virology*, 89(1), 1-47.
- Ray, P. G., Kelkar, S. D., Walimbe, A. M., Biniwale, V. y Mehendale, S. (2007). Rotavirus immunoglobulin levels among Indian mothers of two socio-economic groups and occurrence of rotavirus infections among their infants up to six months. *Journal of medical virology*, 79(3), 341-349.
- Robek, M. D., Boyd, B. S. y Chisari, F. V. (2005). Lambda Interferon Inhibits Hepatitis B and C Virus Replication. *Journal of virology*, 79(6), 3851-3854. doi: 10.1128/jvi.79.6.3851-3854.2005
- Rollo, E. E., Kumar, K. P., Reich, N. C., Cohen, J., Angel, J., Greenberg, H. B., . . . Hempson, S. J. (1999). The epithelial cell response to rotavirus infection. *The Journal of Immunology*, 163(8), 4442-4452.
- Ruby, J., Bluethmann, H. y Peschon, J. J. (1997). Antiviral activity of tumor necrosis factor (TNF) is mediated via p55 and p75 TNF receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 186(9), 1591-1596.
- Saha, S. K., Pietras, E. M., He, J. Q., Kang, J. R., Liu, S. Y., Oganessian, G., . . . Wang, Y. (2006). Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *The EMBO journal*, 25(14), 3257-3263.
- Saif, L. J. y Thiel, K. (1989). *Viral diarrheas of man and animals*: CRC press.
- Sánchez, M. E. M. (2011). Dinámica de la diferenciación de células Th: modelación con redes booleanas.
- Schoggins, J. W. y Rice, C. M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current opinion in virology*, 1(6), 519-525.

- Seo, S. H. y Webster, R. G. (2002). Tumor Necrosis Factor Alpha Exerts Powerful Anti-Influenza Virus Effects in Lung Epithelial Cells. *Journal of virology*, 76(3), 1071-1076. doi: 10.1128/jvi.76.3.1071-1076.2002
- Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N. y Harrison, S. C. (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *The EMBO journal*, 30(2), 408-416.
- Sharma, S., Grandvaux, N., Zhou, G.-P., Lin, R. y Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*, 300(5622), 1148-1151.
- Stanifer, M. L., Kischnick, C., Rippert, A., Albrecht, D. y Boulant, S. (2017). Reovirus inhibits interferon production by sequestering IRF3 into viral factories. *Scientific reports*, 7(1), 10873.
- Striz, I., Brabcova, E., Kolesar, L. y Sekerkova, A. (2014). Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clinical science*, 126(9), 593-612.
- Tanaka, T., Narazaki, M. y Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, a016295.
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Parashar, U. D., Network, W. H. O. C. G. R. S., Agocs, M., . . . Mihigo, R. (2016). Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013. *Clinical Infectious Diseases*, 62(suppl\_2), S96-S105.
- Telmesani, A. M. (2010). Oral rehydration salts, zinc supplement and rota virus vaccine in the management of childhood acute diarrhea. *Journal of family and Community Medicine*, 17(2), 79.
- Van Campen, H. (1994). Influenza A virus replication is inhibited by tumor necrosis factor- $\alpha$  in vitro. *Archives of virology*, 136(3-4), 439-446.
- Van de Veerdonk, F. L., Netea, M. G., Dinarello, C. A. y Joosten, L. A. (2011). Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection. *Trends in immunology*, 32(3), 110-116.
- Ward, R. L., Knowlton, D. R. y Pierce, M. J. (1984). Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *Journal of clinical microbiology*, 19(6), 748-753.

- Werner, K., Lademann, F., Thepkaysone, M.-L., Jahnke, B., Aust, D. E., Kahlert, C., . . . Pilarsky, C. (2016). Simultaneous gene silencing of KRAS and anti-apoptotic genes as a multitarget therapy. *Oncotarget*, 7(4), 3984.
- Wong, G., Krowka, J., Stites, D. y Goeddel, D. (1988). In vitro anti-human immunodeficiency virus activities of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *The Journal of Immunology*, 140(1), 120-124.
- World Health Organization. (2013). Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013-Recommendations. *Vaccine*, 31(52), 6170-6171.
- Xu, J., Yang, Y., Wang, C. y Jiang, B. (2009). Rotavirus and coxsackievirus infection activated different profiles of toll-like receptors and chemokines in intestinal epithelial cells. *Inflammation Research*, 58(9), 585-592.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. y Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling. *The Journal of Immunology*, 169(12), 6668-6672.
- Zelová, H. y Hošek, J. (2013). TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 62(7), 641-651.

## 12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Tania Guadalupe Heredia Torres

Candidata para el grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

**Tesis:** EFECTO ANTIVIRAL DE CITOCINAS EXPRESADAS EN CÉLULAS MA-104 INFECTADAS CON ROTAVIRUS.

**Campo de Estudio:** Virología.

### **Biografía:**

Datos Personales: Nacida el 23 de diciembre de 1993 en cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Hija de Homero Heredia Córdova y Carmen Gloria Torres Pérez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Chihuahua con el título de Química Bacterióloga Parasitóloga en 2018.

Experiencia profesional: Auxiliar en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua en 2017.

## 13. APÉNDICE

### PROTOCOLOS Y REACTIVOS

#### Protocolo de SDS-PAGE

1. Para analizar la producción de proteínas en cada lisado se puede realizar una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.
2. Preparar un gel de poliacrilamida discontinuo, utilizando un gel separador al 12%, y un gel concentrador al 4%.
3. Primero se prepara el gel separador mezclando los siguientes reactivos:

Reactivo	Poliacrilamida 12%
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	2 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.25ml
SDS 10%	50µl
Agua bidestilada	1.65ml
<b>AGITAR SUAVEMENTE</b>	
Persulfato de Amonio 10%	120µl
TEMED	10µl
Volumen Final	5ml

4. Enseguida se llena el molde para preparar el gel, hasta 2/3 partes y se deja polimerizar.
5. Posteriormente se prepara el gel concentrador al 4% mezclando los siguientes reactivos:



<b>Reactivo</b>	<b>Poliacrilamida 4%</b>
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	0.5ml
Tris-HCl 1 M pH 6.8	0.37ml
SDS 10%	30µl
Agua bidestilada	1.82ml
<b>AGITAR SUAVEMENTE</b>	
Persulfato de Amonio 10%	120µl
TEMED	10µl
Volumen Final	5ml

6. El gel concentrador se vacía encima del gel separador, se inserta un molde para formar los pozos donde se depositarán las muestras y se deja reposando unos minutos hasta polimerice.
7. Se prepara la cámara de electroforesis vertical y se adiciona Buffer de corrimiento SDS-PAGE 1X.
8. La electroforesis SDS-PAGE se realiza aplicando amperaje constante. Primero se corre a 12mA durante 20-30 minutos y después a 20mA durante 40-50 minutos o dejar hasta que el colorante quede en la parte final del gel separador.
9. Para aplicar las muestras en el gel, primero se mezclan con el buffer de carga.
10. Se mezclan 40µl del lisado con 20µl de buffer de carga.
11. Se calienta la mezcla a 95°C por 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.
12. Para iniciar la electroforesis, adicionar al pozo del gel de poliacrilamida 15-18µl de proteína-colorante.
13. Al terminar, dejar el gel de poliacrilamida sumergido en Azul de Coomassie toda la noche a temperatura ambiente, para teñir las proteínas.
14. Retirar la solución y añadir 50ml de una solución decolorante.

15. Adicionar al recipiente que contiene el gel la solución decolorante, un pedazo de esponja y agitar suavemente.
16. Retirar la solución decolorante y adicionar 50l de solución decolorante nueva.
17. Cuando el gel de poliacrilamida quede casi incoloro, a excepción de las bandas de proteínas; termina el proceso de decoloración.
18. Retirar la solución decolorante y hacer 3 lavados del gel con agua bidestilada.

### **Protocolo de Dot-Blot**

1. Utilizando guantes, manipular papel de nitrocelulosa y cortar lo necesario para realizar el ensayo.
2. Aplicar en 5 µl de la mezcla de proteínas de cada una de las muestras.
3. Dejar secar la muestra durante aproximadamente 30 minutos y a temperatura ambiente.
4. Contener el papel en un recipiente.
5. Añadir al recipiente 15 ml de solución TBS-Tween 0.05%-Albumina 0.1% para bloquear.
6. Mezclar a 60 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Retirar el buffer de bloqueo y adicionar el anticuerpo primario (anti VP8\*) diluido 1:500 en 10 ml de buffer de bloqueo.
8. Incubar a 37°C con agitación constante por 30 minutos.
9. Retirar el anticuerpo y lavar 3 veces con 10 ml de TBS-Tween 0.05%. Cada lavado con duración de 5 minutos y agitación constante.
10. Adicionar el conjugado (proteína A) diluido 1:1,500 en 10 ml de buffer de bloqueo.
11. Incubar a 37°C con agitación constante durante 30 minutos.

12. Retirar el conjugado y lavar con 10 ml de TBS-Tween 0.05% con agitación constante durante 10 minutos.
13. Realizar otros 2 lavados extra con agitación constante durante 5 minutos cada uno.
14. Adicionar por un costado del papel, 700 µl del sustrato (fosfatasa alcalina).
15. Parar la reacción lavando el papel 3 veces con agua bidestilada.
16. Dejar secando el papel durante aproximadamente 1 hora.

#### **Protocolo de electroforesis para detección de RNA de rotavirus.**

1. Preparar un gel al 10% de poliacrilamida mezclando los siguientes reactivos:

<b>Reactivo</b>	<b>Poliacrilamida 10%</b>
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	2 ml
Tris-HCl 2 M pH 8.8	1.02 ml
Agua bidestilada	2.98 ml
<b>AGITAR SUAVEMENTE</b>	
Persulfato de Amonio 10%	120 µl
TEMED	10 µl
Volumen Final	6 ml

2. Colocar el gel en la cámara de electroforesis.
3. Esperar a polimerización.
4. Preparar y añadir el buffer de corrimiento.
5. Dejar corriendo a 100 V durante 10 minutos.
6. Mezclar 3 µl de muestra de ARN con 2 µl de azul de bromofenol y depositar a los pozos.
7. Realizar la electroforesis a 140 V por 4 horas.

8. Terminada la electroforesis sumergir el gel en 100 ml de solución fijadora durante 30 minutos.
9. Retirar la solución fijadora y preparar 100 ml de solución de nitrato de plata 1X. Mantener en oscuridad el gel durante 30 minutos.
10. Preparar 100 ml de solución reveladora.
11. Retirar la solución de plata y lavar 3 veces con agua bidestilada.
12. Adicionar solución reveladora y esperar a que se visualicen las bandas del ARN.
13. Preparar y adicionar 50 ml de solución de contraste.

### **Preparación de reactivos para cultivo celular**

#### **PBS A 10X:**

Pesar los siguientes reactivos:

8.00 g de Cloruro de sodio

0.20 g de Cloruro de potasio

0.20 g de Fosfato monobásico de potasio ( $K_2HPO_4$ )

1.44 g de Fosfato dibásico de sodio ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ )

Aforar a 100 ml con agua bidestilada.

#### **EDTA 0.68 mM:**

Pesar 0.2 gr de EDTA (sal disódica) y disolverlos en 900 ml de agua bidestilada. Adicionar 100 ml de PBS A 10X. Se esteriliza en autoclave y se almacena a 4°C. Cuando se utilice en el subcultivo debe atemperarse.

#### **D-MEM:**

El medio de cultivo utilizado para este estudio es adicionado con 1 ml de L-Glutamina 200 mM y 3 ml de suero fetal de bovino por cada 100 ml de medio. Debe almacenarse a 4°C y cuando se utilice en el subcultivo debe atemperarse.

**MEM:**

El medio de cultivo utilizado para este estudio es adicionado con 1 ml de L-Glutamina 200 mM y 1 ml de HEPES 1 M por cada 100 ml de medio. Si se utiliza para infectar células con virus, no requiere suero fetal de bovino. En cambio, si se utiliza para subcultivar se debe adicionar con 10 ml de suero fetal de bovino por cada 100 ml de medio. Debe almacenarse a 4°C y cuando se utilice en el subcultivo debe atemperarse.

**Acetona 80%- PBS A 5X:**

Se prepara 20 ml de PBS A 5X (a partir de la solución 10X) y se mezcla con 80 ml de acetona concentrada. Se mezcla bien y se almacena a temperatura ambiente.

**Buffer de acetatos 0.05 M pH 5:**

Para preparar 50 ml, se pesa 0.2 g de acetato de sodio, se diluye en 45 ml de agua bidestilada y se ajusta el pH de la solución con ácido acético concentrado. Posteriormente se afora a 50 ml con agua bidestilada. La solución se almacena a temperatura ambiente. Caducidad de 1 mes.

**Carbazole (4 ml/ ml):**

Para preparar 20 ml, usando guantes, se pesan 80 mg de carbazole y se disuelven en 20 ml de N,N-Dimetilformamida. Antes de disolver el carbazole, tomar con una pipeta de vidrio los 20 ml y depositarlos en un frasco de vidrio con tapa de rosca, previamente envuelto en papel aluminio. Disolver el carbazole y mezclar con movimientos suaves el frasco. Cerrar bien el frasco y almacenar la solución a 4°C.

**Sustrato para unidades formadoras de focos:**

Se mezcla 4 ml de buffer de acetatos 0.05 M pH 5, 5 µl de peróxido de hidrógeno 30% y 1.5 ml de carbazole 4 mg/ml. Realizada la mezcla, con el uso de guantes, filtrar el sustrato a través de un filtro de 0.45 micras. Almacenar el filtrado tapado con papel aluminio y a temperatura ambiente.

## **Preparación de reactivos utilizados para técnicas de biología molecular**

### **Tris-HCl 1 M pH 6.8:**

Disolver 12.1 g de Tris base en 70 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 6.8 utilizando HCl concentrado. Aforar a 100 ml y almacenar a 4°C.

### **SDS 10%:**

Pesar 1 g de SDS en un vaso de precipitado de 50 ml y sobre este añadir 8 ml de agua bidestilada. Mezclar muy suavemente con una espátula para evitar formación de muchas burbujas. Aforar a 10 ml y almacenar a temperatura ambiente.

### **Buffer de carga para SDS-PAGE:**

Preparar la solución en tubo cónico de 15 ml mezclando los siguientes reactivos:

0.6 ml Tris-HCl 1 M pH 6.8

5 ml Glicerol 50%

2 ml SDS 10%

0.5 ml 2-Mercaptoetanol

1 ml azul de bromofenol 1%

Tapar el tubo cónico y mezclar por inversión varias o veces. Cubrir con papel aluminio y almacenar a 4°C.

### **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:**

Disolver 18.1 g de tris base en 70 ml de agua bidestilada, ajustar pH a 8.8 utilizando HCl concentrado. En seguida aforar a 100 ml y almacenar a 4°C

### **Persulfato de amonio 10%:**

Disolver 3 g de persulfato de amonio en 20 ml de agua bidestilada (si no hay efervescencia, significa que el reactivo ya tiene mucho tiempo y no es recomendable su uso). Aforar a 30 ml y pasarlo a un tubo cónico de 50 ml. Cubrir con papel aluminio y almacenar a 4°C.

**Buffer de corrimiento tris-glicina-SDS 10X:**

Disolver en 100 ml de agua bidestilada los siguientes reactivos:

6 g de tris base

28.8 g de glicina

2 g de SDS

Aforar a 200 ml y almacenar a temperatura ambiente. La solución de trabajo es al 1 X.

**Azul de coomassie:**

Disolver 1 g de azul brillante de coomassie en 450 ml de metanol en un vaso de precipitado de 1000 ml. Agitar durante 1 hora. Adicionar 450 ml de agua bidestilada y continuar agitando durante 1 hora. Añadir 100 ml de ácido acético y agitar durante 10 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

**Solución decolorante:**

Disolver 10 ml de metanol y 10 ml de ácido acético en 50 ml de agua bidestilada y adorar a 100 ml.

**TBS-Tween 0.05%:**

Disolver 1.21 g de tris base y 4.38 g de NaCl en 450 ml de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.5 usando HCl y aforar a 500 ml. Continuando con la agitación, adicionar 250 µl de Tween 20. Almacenar a temperatura ambiente.

**Tris-HCl 2 M pH 8.8:**

Disolver 24.2 g de tris base en 70 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 8.8, utilizando HCl concentrado. Aforar a 100 ml y almacenar a 4°C.

**Buffer de corrimiento Tris-Glicina 10X:**

Disolver 7.2 g de tris base y 34.6 g de glicina en 200 ml de agua bidestilada y aforar a 300 ml. Almacenar a temperatura ambiente. Para su uso, la concentración de trabajo es 1X.

**Buffer de carga azul de bromofenol:**

Disolver 0.05 g de azul de bromofenol en 70 ml de agua bidestilada. Adicionar 10 ml de glicerina y mezclar. Aforar a 100 ml y almacenar a temperatura ambiente.

**Solución fijadora:**

Mezclar 10 ml de alcohol etílico absoluto y 0.5 ml de ácido acético en 50 ml de agua bidestilada. Aforar a 100 ml.

**Nitrato de Plata 100X:**

Disolver 5.5 g de nitrato de plata en 20 ml de agua bidestilada y aforar a 30 ml. Pasar a un frasco ámbar y almacenar a 4°C. La solución de trabajo es a una concentración de 1 X.

**Solución reveladora:**

Mezclar 7.5 ml de NaOH 10 M y 1.5 ml de formaldehído 37% en 50 ml de agua bidestilada y aforar a 100 ml.

**Hidróxido de Sodio 10 M:**

Disolver 40 g de NaOH en 50 ml de agua bidestilada y aforar a 100 ml. Almacenar a temperatura ambiente. Reacción exotérmica.

**Solución de contraste:**

Mezclar 2.5 ml de ácido acético en 40 ml de agua bidestilada y aforar a 50 ml.

**Gel de agarosa:**

Mezclar la cantidad de gramos dependiendo del porcentaje deseado en 100 ml de TAE 1X. Calentar el matraz a ebullición para disolver la agarosa. El sobrante puede almacenarse.



**Buffer de corrimiento TAE 50X:**

Disolver 1.5 g de tris base en 80 ml de agua bidestilada, continuando con la agitación adicionar 10 ml de EDTA 0.5 M pH 8 y agitar 5 minutos más. Adicionar 2.7 ml de ácido acético y continuar agitando otros 5 minutos. Aforar a 100 ml con agua bidestilada. Almacenar a temperatura ambiente. La concentración de trabajo es al 1 X.

**Bromuro de etidio:**

Usar guantes y cubreboca para disolver 0.2 g de bromuro de etidio en 20 ml de agua bidestilada. Pasar el reactivo a un tubo cónico de 50 ml. Proteger de la luz y almacenar a temperatura ambiente. Para preparar la solución de tinción de mezcla 10  $\mu$ l en 100 ml de buffer TAE 1X.